



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE LOS  
RECEPTORES QUE ACTIVAN LA PROLIFERACIÓN  
PEROXISOMAL (PPARS) EN UN MODELO  
DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

MARÍA DE LA LUZ IBARRA LARA

DIRECTOR (A) DE TESIS: DRA. MARÍA ALICIA SÁNCHEZ MENDOZA

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de Octubre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MARÍA DE LA LUZ IBARRA LARA** con número de cuenta 505017291 con la tesis titulada "Efecto de la estimulación de los Receptores que activan la Proliferación Peroxisomal (PPARs) en un modelo de hipertensión arterial", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ALICIA SÁNCHEZ MENDOZA**:

Presidente: DRA. VERÓNICA GUARNER LANS  
Vocal: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO  
Secretario: DRA. MARÍA ALICIA SÁNCHEZ MENDOZA  
Suplente: DRA. BEATRIZ VÁZQUEZ CRUZ  
Suplente: DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de Octubre de 2008.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

*Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme haber realizado mis estudios de posgrado en esta máxima casa de estudios.*

*El presente trabajo fue desarrollado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el donativo 44173-M.*

*Agradezco a la Dra. Francisca Pérez Severiano y al Dr. Maximilano Ibarra Barajas miembros del Comité Tutorial por las valiosas observaciones que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto.*

*Agradezco profundamente a la Dra. María Alicia Sánchez Mendoza y al Dr. Gustavo Pastelín por la confianza, sabios consejos y apoyo que me brindaron durante esta etapa de mi formación.*

*Dedico este trabajo:*

*A DIOS por estar conmigo en cada momento.*

*A mis hijos Paquito, Pau, y Vany  
Gracias por enseñarme cada día a ser una mejor  
persona y por ser lo más importante en mi vida,  
Los amo.*

*A mi esposo Miguel Angel, que  
con su amor, comprensión y paciencia  
logró que este proyecto pudiera realizarse.  
Gracias por ser mi apoyo y estar siempre a mi lado.  
Te amo.*

*A mis Padres que con sus sabios consejos y  
optimismo me han enseñado que la gloria  
no consiste en no caer nunca, sino más bien  
en levantarse todas las veces que sea necesario.*

*A mi hermano Richie a mi cuñada  
Rebe y a mi querido sobrino Ciro Ricardo  
por su apoyo en todo momento.*

*A mis queridos compañeros de  
laboratorio del Departamento de Farmacología:  
Luz Graciela, María, Paola, Margarita,  
Leo, Ale<sup>†</sup>, Gaby, Juan Carlos, Julieta, Arturo,  
Sr. Saúl y Ere les agradezco su amistad  
y sus palabras de aliento en los momentos difíciles.*

*Este trabajo fue desarrollado bajo la  
dirección de la Doctora María Alicia  
Sánchez Mendoza en el laboratorio de  
Reactividad Vascular del Departamento de  
Farmacología del Instituto Nacional de  
Cardiología “Ignacio Chávez”.*

# **INDICE**

	<i><b>Página</b></i>
<b><i>I.- Introducción</i></b>	
1.1.- Presión arterial	<b>1</b>
1.1.1.- Fisiología	<b>1</b>
1.1.2.- Control de la presión arterial	<b>2</b>
1.2.3.- Sistema Renina Angiotensina (SRA) como mecanismo de control de la presión arterial.	<b>3</b>
1.2.- Hipertensión arterial	<b>9</b>
1.2.1.- Definición	<b>9</b>
1.2.2.- Clasificación	<b>9</b>
1.3.- Radicales libres de oxígeno y nitrógeno	<b>12</b>
1.3.1.- Introducción	<b>12</b>
1.3.2.- Características de las distintas especies de oxígeno y nitrógeno	<b>14</b>
1.3.2.1.- Ozono	<b>14</b>
1.3.2.2.- Oxígeno singulete	<b>14</b>
1.3.2.3.- Radical superóxido	<b>15</b>
1.3.2.4.- Peróxido de hidrógeno	<b>16</b>
1.3.2.5.- Radical hidroxilo	<b>16</b>
1.3.2.6.- Oxido nítrico	<b>16</b>
1.3.3.- Fuentes de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	<b>23</b>
1.3.3.1.- NAD(P)H oxidasa	<b>23</b>
1.3.3.2.- Xantina oxidasa	<b>24</b>
1.3.3.3.- Sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS)	<b>25</b>
1.4.- Daño que causan las especies reactivas de oxígeno y mecanismos de reparación	<b>26</b>
1.4.1.- DNA	<b>26</b>
1.4.2.- Proteínas	<b>27</b>
1.4.3.- Lípidos	<b>28</b>
1.5.- Estrés oxidativo e hipertensión	<b>29</b>
1.6.- Enzimas antioxidantes	<b>32</b>
1.6.1.- Superóxido dismutasa	<b>33</b>
1.6.2.- Catalasa	<b>37</b>
1.7.- Receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPARs)	<b>38</b>
1.7.1.- Definición	<b>38</b>
1.7.2.- Elemento de respuesta a la proliferación peroxisomal (PPRE)	<b>40</b>
1.7.3.- Ligandos	<b>40</b>
1.7.4.- Coactivadores/Correpresores	<b>41</b>
1.7.5.- Mecanismos de acción	<b>41</b>
1.7.6.- PPAR $\alpha$	<b>43</b>
1.7.7.- PPAR $\alpha$ e hipertensión	<b>44</b>
<b><i>II.- Hipótesis</i></b>	<b>47</b>
<b><i>III.- Objetivos</i></b>	<b>47</b>
3.1.- Objetivo general	<b>47</b>
3.2.- Objetivos particulares	<b>47</b>
<b><i>IV.- Material y Métodos</i></b>	<b>48</b>
4.1.- Material	<b>48</b>



4.2.- Métodos	49
4.2.1.- Coartación aórtica	49
4.2.1.1.- Fisiopatología	49
4.2.2.- Registro de la presión arterial	49
4.2.3.- Preparación de la muestra biológica	50
4.2.4.- Determinación protéica por el método Bradford	50
4.2.5.- Determinación de la actividad enzimática de la SOD	51
4.2.6.- Determinación de la actividad enzimática de la catalasa	52
4.2.7.- Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno	53
4.2.8.- Cuantificación de la peroxidación lipídica	53
4.2.9.- Expresión protéica de NOS-3, SOD, AT <sub>1</sub> y AT <sub>2</sub>	54
<b><i>V.- Resultados</i></b>	<b>57</b>
<b><i>VI.- Discusión</i></b>	<b>77</b>
<b><i>VII.- Conclusiones</i></b>	<b>83</b>
<b><i>VIII.- Anexo</i></b>	<b>85</b>
<b><i>VIII.- Referencias bibliográficas</i></b>	<b>89</b>

## *Tabla de abreviaturas*

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singulete
ADH	Hormona antidiurética
AF-1	Dominio A/B amino terminal de los PPARs
$\text{BH}_4$	Tetrahidrobiopterina
cNOS	Sintasa del óxido nítrico constitutiva
DBD	Dominio de unión al DNA
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECSOD	Súperoxido dismutasa extracelular
EDRF	Factor relajante derivado de endotelio
ECG	Electrocardiograma
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
FSR	Flujo sanguíneo renal
GC	Gasto cardíaco
$\text{GMP}_C$	Guanosina monofosfato cíclico
GSH-Px	Glutación peroxidasa
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
$\text{HO}^\cdot$	Radical hidroxilo
$\text{HO}_2^\cdot$	Radical hidroperoxilo
HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
IMA	Infarto agudo del miocardio
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
IVI	Insuficiencia ventricular izquierda
LBD	Dominio de unión al ligando
LEC	Líquido extracelular
NADPH	Oxidasa de la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato.
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal
NO	Oxido nítrico
$\text{NO}^-$	Aniones nitroxil
NOS	Sintasa del óxido nítrico
$\text{O}_2$	Oxígeno atómico
$\text{O}_2^-$	Radical superóxido
$\text{O}_3$	Ozono
ONOOH	Acido peroxinitroso
PA	Presión arterial
PBP	Proteína de unión a PPAR
PG	Prostaglandinas
PPAR	Receptores que activan la proliferación peroxisomal
PPRE	Elemento de respuesta de los PPAR
RARs	Receptores del ácido retinoico
RL	Radical libre
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RVP	Resistencia vascular periférica
RV	Retorno venoso

RXR	Receptor retinoico X
SOD	Súperoxido dismutasa
SOD <sub>Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup></sub>	Súperoxido dismutasa dependiente de Cobre/Zinc
SODEC	Súperoxido dismutasa extracelular.
SODMn <sup>2+</sup>	Súperoxido dismutasa dependiente de manganeso
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema-renina-angiotensina-aldosterona
TRs	Receptores de la hormona tiroide
VS	Volúmen sanguíneo

## ***Resumen***

La hipertensión arterial secundaria a la coartación aórtica, produce una serie de cambios hemodinámicos que originan aumento de la presión arterial en la porción proximal y normotensión en la porción distal a la coartación, pulso débil en las extremidades inferiores y signos de insuficiencia cardiaca en etapas tardías. La disminución de la luz aórtica a nivel interrenal, produce un aumento en la actividad del sistema renina-angiotensina, donde la angiotensina II tiene un papel crucial como agente presor, así mismo hay una contribución importante de otras sustancias que favorecen a la vasoconstricción incrementando la presión arterial. Estudios recientes han demostrado que los PPARs pueden ser considerados como blancos terapéuticos potenciales en los procesos que cursan con hipertensión arterial. Los PPARs son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, cuya activación promueve la expresión de genes codificados en secuencias específicas del DNA. Existen tres diferentes isoformas, los PPAR alfa, PPAR beta/delta y PPAR gamma. Los PPAR $\alpha$  se encuentran predominantemente en hígado, corazón, riñón y músculo donde participan en el metabolismo lipídico actuando como un sensor de los niveles de ácidos grasos libres en los tejidos. Cada uno de los PPARs puede ser activado por ligandos específicos. El clofibrato así como otros agentes hipolipemiantes son considerados específicos para activar al subtipo alfa. En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue estudiar si la estimulación de los PPAR $\alpha$ , por clofibrato (100mg/Kg) en un modelo de hipertensión arterial inducida por coartación aórtica reduce el aumento de la presión arterial en ratas con coartación aórtica; así como determinar si la estimulación de estos receptores aumenta la expresión y actividad de las enzimas involucradas en la regulación del estado “redox” en órganos blanco como ventrículo izquierdo y riñón hipertrófico. Ratas Wistar machos de 250-280g se separaron en tres grupos 1) ratas sham-tratadas con vehículo 2) ratas coartadas tratadas con vehículo y 3) ratas coartadas tratadas con clofibrato (100mg/Kg). El tratamiento se administró por 1 y 21; días al término de cada período las ratas se anestesiaron y se les registró la presión sanguínea, se obtuvo el riñón hipertrófico y el ventrículo izquierdo para cuantificar la expresión y actividad de las enzimas SOD, catalasa y NOS3. La estimulación de los PPAR $\alpha$  por acción de clofibrato (100mg/Kg) disminuyó la presión arterial en la etapa aguda posterior al daño (1 día). Este efecto parece deberse a un aumento de la participación de los sistemas antioxidantes (SOD y catalasa), los cuales se activan para minimizar el

daño producido por la coartación aórtica, la isquemia renal y la consecuente sobreproducción de especies reactivas del oxígeno. El efecto antioxidante se presenta en el riñón que soporta el mayor trabajo renal y en el ventrículo izquierdo. Respecto a la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial, esta parece no tener participación en la modulación de la presión arterial en este estadio de la hipertensión. Por otra parte, la expresión de los receptores  $AT_2$  es mayor en las ratas tratadas con el fármaco en ventrículo izquierdo como en riñón hipertrófico en 1 día de tratamiento.

La estimulación de los  $PPAR\alpha$  por acción de clofibrato (21 días) evitó efectivamente la hipertensión inducida por la coartación de la aorta. Durante la fase sub-crónica de la hipertensión arterial inducida por coartación de la aorta, los mecanismos de defensa antioxidante (SOD y Catalasa) no modifican su actividad, respecto a las ratas normotensas, en los tejidos estudiados (riñón hipertrófico y ventrículo izquierdo). Sin embargo, la sintasa del óxido nítrico endotelial y la disminución de la expresión de los receptores  $AT_1$  en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100mg/kg) parecen tener participación en la modulación de la presión arterial en este estadio de la hipertensión. Nuestros resultados sugieren que la estimulación de los  $PPAR\alpha$  por clofibrato evita el aumento de la presión sanguínea a través de un efecto anti-oxidante en las etapas agudas (1 día) posteriores a la coartación y por acción de la sintasa del óxido nítrico endotelial y disminución de los receptores  $AT_1$  en etapas sub-crónicas (21 días) de la hipertensión arterial.

## ***Abstract***

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of nuclear receptors that, upon activation with selective ligands, work as transcription factors. Recently, they have been implicated, at different levels, in functioning of the cardiovascular system. Our aim was to study if PPAR $\alpha$ -stimulation with clofibrate exerts a lowering effect over blood pressure in rats with hypertension secondary to aortic coarctation and to explore a possible mechanism. Male Wistar rats (250-280g) were randomly distributed into three groups: 1) Sham-operated vehicle-treated; 2) aortic coarctated vehicle-treated or 3) aortic coarctated clofibrate (100mg/kg)-treated. The treatment lasted for 1 or 21d starting the day of the surgery. At the end of the treatment, we measured blood pressure intra-carotid and obtained hypertrophic kidney and left ventricle to measure reactive oxygen species (ROS), peroxidated lipids, expression and activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, and nitric oxide synthase-3 (NOS3). PPAR $\alpha$ -stimulation by clofibrate lowered blood pressure at both 1d- (111.2 $\pm$ 2.3, 156.8 $\pm$ 9.4, and 125 $\pm$ 4.7 mmHg, for sham, aortic coarctated vehicle-treated and aortic coarctated clofibrate respectively) and 21d-treatment (110.1 $\pm$ 6.1, 175 $\pm$ 10.1, and 133.8 $\pm$ 10.8 mmHg, for sham, aortic coarctated vehicle-treated and Aortic coarctated clofibrate, respectively). ROS increased after 1d in hypertrophic kidney and left ventricle from aortic coarctated vehicle-treated rats and clofibrate partially prevented this effect (0.77 $\pm$ 0.2, 2.5 $\pm$ 1, and 1.01 $\pm$ 0.5 nmoles DFC/mgprot/min, for sham, aortic coarctated vehicle-treated and aortic coarctated clofibrate, respectively), ROS were not modified after 21d of treatment in either group. The expression of SOD increased significantly upon PPAR $\alpha$ -stimulation after 1d of treatment (3.6-fold) and returned to normal values by day 21, its activity increased slightly in response to clofibrate. The activity of catalase increased in hypertrophic kidney from aortic coarctated clofibrate at 1d and returned to normal at 21d. NOS-3 expression was not different after 1d treatment but, was significantly higher in hypertrophic kidney from aortic coarctated clofibrate at day 21. Angiotensin II receptors (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) were inversely modified at day 21 of treatment in response to clofibrate treatment, AT<sub>1</sub> expression decreased compared to aortic coarctated vehicle-treated, while AT<sub>2</sub> increased in hypertrophic kidney from aortic coarctated clofibrate compared to aortic coarctated vehicle-treated. Our results suggest that, in the early development of hypertension secondary aortic coarctation, the

stimulation of PPAR $\alpha$  induces an increase in the antioxidant defences leading to an improvement of the endothelial factors that modulate the blood pressure. While, in the subchronic phase factors as endothelial NOS and angiotensin II receptors seem to play a major role controlling the blood pressure.

# ***I.- INTRODUCCIÓN***

## ***1.1.- Presión arterial.***

### ***1.1.1.- Fisiología***

La presión arterial (PA) es la fuerza o tensión que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos. Esta fuerza es generada por el corazón en su función de bombeo de sangre. Por su parte las arterias son las receptoras de esa "fuerza" que representa el flujo sanguíneo, y para adaptarse a él, poseen fibras musculares en su pared que amortiguan y se adaptan a la presión que sobre ellas realiza la sangre bombeada. Dependiendo de la fase del ciclo cardíaco donde se lleve a cabo el registro, se pueden identificar a la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y presión arterial media y esta se expresa en mmHg (Oparil S, 1992).

Si entendemos por presión arterial a la fuerza que ejerce la sangre bombeada desde el corazón sobre los vasos sanguíneos arteriales, es fácil deducir que los factores determinantes de la misma son:

- La cantidad de sangre que el corazón bombea (gasto cardíaco).
- Calibre o diámetro de los vasos (resistencia).

*GASTO CARDIACO (GC):* Está determinado por la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción, estos a su vez están en función del retorno venoso que depende de otros factores como son: la actividad constrictora o dilatadora de las venas, la actividad del sistema renal, etc.

*RESISTENCIA VASCULAR PERIFERICA (RVP):* Depende de la actividad constrictora o dilatadora de las arteriolas, del eje renina angiotensina y de la propia magnitud del GC.

Por tanto, PA regulada por estos dos factores es expresada por la siguiente formula:

$$\mathbf{PA = GC \times RVP}$$



### ***1.1.2.- Sistemas de control de la presión arterial***

Los mecanismos fisiológicos que intervienen en el control de la PA son múltiples; mantienen una estrecha relación entre sí y garantizan la homeostasis del organismo (Cruz Mérida A, 2004).

Estos sistemas de control son:

**A.-** Mecanismos nerviosos. Es el sistema que actúa más rápidamente (*segundos*) para controlar desajustes de la PA

- Barorreceptores
- Quimiorreceptores
- Respuesta isquémica del sistema nervioso central
- Receptores de baja presión

Otros mecanismos de respuesta rápida

- Participación de los nervios y músculos esqueléticos
- Ondas respiratorias

**B.-** Sistema de regulación de acción intermedia (*minutos*)

- Vasoconstricción por el sistema renina angiotensina
- Relajación de los vasos inducido por estrés
- Movimiento de los líquidos a través de las paredes capilares
- Vasoconstricción por noradrenalina-adrenalina
- Vasoconstricción por la vasopresina

**C.-** Mecanismos a largo plazo (*horas y días*)

- Control Renal
- Sistema renal de líquidos corporales
- Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA)

### ***1.1.3.-Sistema renina-angiotensina (SRA) como mecanismo de control de la presión arterial***

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un sistema hormonal endógeno que, actuando en colaboración con el sistema nervioso autónomo, controla el calibre de los vasos, constituyendo un elemento de primer orden en la regulación de la PA. Cuando este sistema falla, ello constituye un factor importante en la patogenia de la hipertensión arterial.

La angiotensina es una hormona que descubrieron Braun-Menéndez y su grupo, en Argentina hacia 1939 (Touyz R, 2000; Ibarra-Rubio ME y Pedraza Chaverri, 1993). Casi al mismo tiempo, el grupo de Page, (Touyz R, 2000; Ibarra-Rubio ME y Pedraza Chaverri, 1993) hizo el mismo descubrimiento. Cada uno de estos grupos dio un nombre al compuesto generado en el plasma, el primero lo llamó "hipertensina" y el segundo "angiotonina". Fue necesario que pasaran casi 20 años, para que se pusieran de acuerdo los investigadores del campo en el nombre adecuado para la hormona, y en 1957 se le dio el nombre de angiotensina. Actualmente sabemos que hay tres angiotensinas: la I, II y III, las cuales son productos cada vez más pequeños; es decir, del angiotensinógeno se forma la angiotensina I, de ella la angiotensina II y de ésta a su vez la angiotensina III; la más activa es la angiotensina II (Touyz R, 2000; Ibarra-Rubio ME y Pedraza Chaverri, 1993).

El SRA está constituido por 5 componentes que son: la renina, el sustrato o angiotensinógeno, la angiotensina I (Ang I), la enzima de convertidora de angiotensina (ECA) y la angiotensina II (AngII) (Esquema 1).

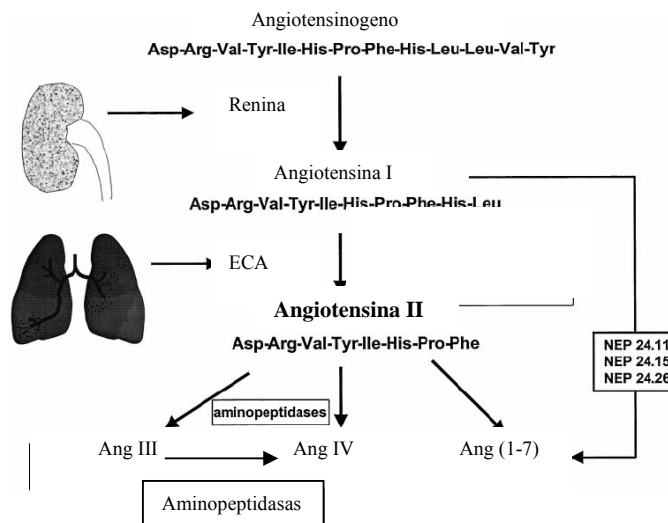
En 1836 se empezaron a hacer las primeras observaciones que trataban de establecer una relación entre el riñón y el sistema cardiovascular. De esta manera el inglés Richard Bright determinó que los pacientes que morían con los riñones pequeños frecuentemente tenían un "pulso firme" y presentaban hipertrofia cardíaca. Posteriormente, Tiggersted y Bergman realizaron un experimento basado en la inyección de extracto acuoso y alcohólico de la corteza renal de los conejos; aplicándolos a estos animales, tenían una acción bifásica, con un descenso inicial de presión, seguido por una elevación de la misma. El llamó a esta sustancia renina y publicó su estudio en 1898. Se pensó en esa época que la renina era la sustancia que producía directamente el

efecto presor. Posteriormente, Page y Helmer en EUA y Braun demostraron que la renina era solamente una enzima que actuaba sobre un sustrato del plasma para producir angiotensina. La renina es una endopeptidasa altamente específica con peso molecular de 40000 daltons, que es sintetizada principalmente en las células yuxtglomerulares de la arteriola glomerular aferente del riñón; Sin embargo, a pesar de que la renina fue considerada largo tiempo una enzima exclusivamente renal se ha descubierto síntesis de la misma en diversos tejidos como glándulas salivales, útero, testículos, adrenales, vasos sanguíneos y cerebro. Lo que conlleva a que la AngII producida a partir de la acción de la renina no debe ser considerada como una hormona exclusivamente tisular, sino también una neurohormona o neurotransmisor. Los mecanismos liberadores de renina son: disminución de la presión de perfusión renal, aumento de la actividad del sistema nervioso simpático, concentración baja de sodio en la mácula densa y diversas señales humorales (Ibarra-Rubio ME y Pedraza Chaverri J, 1993).

El angiotensinógeno humano es una proteína cuyo peso molecular varía entre 61400 y 65000 daltons. Inicialmente, se consideraba que era producción exclusivamente hepática, pero en la actualidad se sabe que se produce en diversos órganos como cerebro y pituitaria. Las concentraciones plasmáticas representan el equilibrio entre su síntesis, principalmente hepática y su metabolismo. En condiciones normales, la síntesis es constante y en general en el hígado no hay depósitos significativos. Sin embargo, la síntesis hepática y las concentraciones plasmáticas están aumentadas por estrógenos, glucocorticoides y hormonas tiroideas. Su importancia radica en que la concentración de angiotensinógeno limita la velocidad de su reacción con la renina de tal manera que las variaciones en su concentración tiene importante influencia en la velocidad de producción de angiotensina y por lo tanto en la efectividad biológica del sistema renina angiotensina *in vivo*.

La angiotensina I es una prohormona decapeptídica que resulta de la acción de la renina sobre el angiotensinógeno. No tiene acciones biológicas conocidas, aparte de ser sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para la generación de AngII. La ECA es una dipeptidil-carboxipeptidasa, capaz de escindir el dipéptido terminal histidil-leucina de la AngI y dar lugar así a la hormona efectora del sistema, la AngII. Esta enzima convertidora de angiotensina se detecta sobre todo unida a la membrana plasmática de las células endoteliales del pulmón, y a partir de este órgano ha sido

posible su purificación (Schutz S *et al*, 1996). Se trata de una glucoproteína que contiene un 25% de carbohidratos con un peso molecular entre 125.000 y 180.000 daltons y su molécula contiene un átomo de zinc, esencial para que sea activa. Por último, a través de la acción de las aminopeptidasas sobre la AngII se forman la AngIII y la AngIV la primera está formada por siete aminoácidos y posee el 50% de la actividad presora de la AngII; la segunda es un hexapéptido y es considerado inactivo. Es importante señalar que la AngI puede también ser convertida en el hexapéptido Ang(1-7) por ciertas endopeptidasas titulares tales como la endopeptidasa neutral (NEP) 24.11, NEP 24.15 y NEP (24.26). La Ang(1-7) es un vasodilatador en muchos lechos vasculares, incluyendo el coronario de perros y cerdos y bloquea la vasoconstricción inducida por AngII en arterias humanas (Rocks AJ *et al*, 1999). Los efectos de la Ang(1-7) son probablemente mediados por un aumento de la síntesis de bradicinina, quien a su vez estimula la liberación de prostaciclina y NO (Rocks AJ *et al*, 1999).



**Esquema 1.** Representación gráfica del sistema clásico Renina-Angiotensina (Tomado de: Touyz RM, 2000).

La AngII es un octapéptido que por muchos años fue el más poderoso vasoconstrictor del organismo, cediendo su paso solo algunos años a la endotelina. Inicialmente se pensó que era básicamente vascular pero hoy se conoce que se produce en el riñón, corazón, endotelio etc. La AngII no se produce solamente a través de la ECA sino que

existen vías no clásicas para la generación de la misma, que incluye catepsina, toninas y quimasas. A diferencia de la ECA, que se expresa en la superficie endotelial, y es secuestrada en el espacio intersticial, la quimasa es secuestrada en el compartimento intracelular y puede ser inhibida por proteasas. Los efectos de la AngII se observan en la tabla I.

**Tabla 1**

<b>TEJIDO</b>	<b>ACCIÓN</b>
Vascular	Vasoconstricción Hipertrofia muscular lisa
Corteza adrenal	Síntesis y secreción de aldosterona
Médula adrenal	Liberación de epinefrina
Riñón	Vasoconstricción aferente y eferente Inhibición de la liberación de renina
Corazón	Reabsorción de sodio Hipertrofia miocárdica

*Tabla 1- Acciones de la angiotensina (Winton EM 1996; Shanmugam S y Sandberg K 1996)*

Existen diversos receptores a través de los cuales la AngII ejerce sus acciones (tabla 2). El receptor más importante es el AT<sub>1</sub>, receptor de dominio transmembrana, acoplado a la proteína G; cuando la AngII se une a él se intercambia GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  del receptor asociado a proteína G, ocurriendo estimulación o inhibición de enzimas asociadas a la membrana, tales como la fosfolipasa C y la adenil ciclasa. Luego de esto, la concentración intracelular del segundo mensajero se altera. Por ejemplo, los niveles de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), y diacilglicerol se incrementan y los de AMPc y GMPc disminuyen. Esos cambios en el segundo mensajero, hacen que IP3 remueva calcio desde los depósitos intracelulares y lleva en un inicio a un rápido crecimiento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> y fosfatidilserina (Touyz RM y Berry C, 2002; Touyz RM, 2000). Este receptor es constante expresado en el sistema cardiovascular y en otros tejidos a lo largo del organismo, favoreciendo no solo la vasoconstricción sino los efectos de proliferación vascular al incrementar el factor de crecimiento de los fibroblastos y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, contribuyendo de esta manera al remodelamiento cardiovascular. Sin embargo su papel va más allá, pues además de favorecer la proliferación muscular activa los macrófagos e incrementa su

capacidad de adhesión a la pared vascular, facilitando el desarrollo de la placa aterosclerótica.

El receptor AT<sub>2</sub> parece estar acoplado a través de proteínas G (aún no bien identificadas) a una fosfatasa de proteínas para residuos de tirosina. Se ha descrito que, el receptor AT<sub>2</sub> se expresa en el sistema nervioso, y especialmente en ciertas etapas del desarrollo, lo que ha sugerido que tenga participación en la diferenciación de este importante sistema (Wintor EM 1996; Shanmugam S y Sandberg K 1996).

**Tabla 2**

	<b>Receptor AT<sub>1</sub></b>	<b>Receptor AT<sub>2</sub></b>
<b>Localización</b>	Riñón, corazón, células de músculo liso vascular, cerebro, glándulas adrenales, plaquetas, adipositos y placenta	Abundantes en el feto, en el adulto se encuentran en bajas concentraciones en útero, glándula adrenal, sistema nervioso central, cardiomiocitos, fibroblastos y riñón.
<b>Efecto</b>	Vasoconstricción (preferentemente coronaria, renal y cerebral). Retención de sodio y agua Supresión de renina Hipertrofia de miocitos y músculo liso Fibrosis miocárdica y vascular Inotropismo Aumento de la secreción de endotelina Aumento de la liberación de vasopresina Estimulación de la formación de anión super óxido	Vaso dilatación Antiproliferación Inhibición del crecimiento celular Diferenciación celular Reparación tisular Apoptosis Desarrollo del tracto urinario y renal

Tabla 2- Función y localización de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> de la AngII (Wintor EM 1996; Shanmugam S y Sandberg K, 1996)

Como vemos, mientras que la estimulación del receptor  $AT_1$  se asocia a vasoconstricción y crecimiento celular, la estimulación de  $AT_2$  lleva a vasodilatación y diferenciación celular. El bloqueo del receptor  $AT_1$  se acompaña del aumento en los niveles plasmáticos de AngII que se une a los receptores  $AT_2$  no ocupados. La resultante acción tiene numerosos beneficios potenciales en pacientes con fisiología cardiovascular alterada, incluyendo atenuación de los efectos presores mediados por el receptor  $AT_1$ , reversión del remodelamiento cardíaco producido por la hipertensión y protección a órganos blanco principalmente el riñón.

La AngII juega un importante papel en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas. Sus funciones principales se vinculan a modulación de la transmisión sináptica, estimulación de secreción de la vasopresina u hormona antidiurética, estimulación de la sed, vasoconstricción, estimulación de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal y acción mitogénica. Modula la excreción renal de sodio y la contracción y relajación miocárdica y el tono vascular (Touyz RM y Schiffrin E, 2000). De esta forma es un factor muy importante de la integridad anatómico-funcional de la pared arterial y en procesos que regulan la presión arterial. Las acciones múltiples de la AngII están mediadas por complejos sistemas de señalamiento que se ponen en marcha cuando la hormona se une a su receptor; la inapropiada activación del receptor contribuye importantemente al desarrollo de patologías entre ellas la hipertensión arterial.

## ***1.2.- Hipertensión arterial***

### ***1.2.1.-Definición***

Se acepta como hipertensión arterial (HTA) a la elevación crónica de una o de las dos presiones arteriales es decir la sistólica y/o diastólica. (OMS) (Oparil S, 1992).

### ***1.2.2.- Clasificación***

La HTA se puede clasificar de tres maneras distintas (Oparil S, 1992); Por los valores de la PA.

- Por la importancia de las lesiones orgánicas.
- Por la etiología.

***1.-Por los valores de la presión arterial*** (Oparil S, 1992).

#### ***PA Diastólica***

<85	PA normal
85-89	PA normal alta
90-99	HTA ligera (estadío I)
100-109	HTA moderada (estadío II)
≥110	HTA severa (estadío III)

#### ***PA Sistólica***

<130	PA normal
130-139	PA normal alta
140-159	HTA ligera (estadío I)
160-179	HTA moderada (estadío II)
≥ 180	HTA severa (estadío III)



## ***2.-Por la importancia de las lesiones orgánicas:***

Se ha clasificado en fase I, II y III.

Fase I: No se aprecian signos objetivos de alteración orgánica.

Fase II: Aparecen por lo menos uno de los siguientes signos de afección orgánica.

1. Hipertrofia ventricular izquierda (HVI), es detectada por rayos X, electrocardiograma (EKG) y ecocardiografía.
2. Estrechez focal y generalizada de las arterias retinianas.
3. Proteinuria y ligero aumento de la concentración de creatinina en el plasma u orina.

Fase III: Aparecen síntomas y signos de lesión de algunos órganos a causa de la hipertensión arterial en particular:

1. Corazón: Insuficiencia ventricular izquierda (IVI).
2. Encéfalo: Hemorragia cerebral, cerebelar o del tallo encefálico: Encefalopatía hipertensiva.
3. Fondo de ojo: Hemorragia y exudados retinianos con o sin edema papilar. Estos son signos de la fase maligna (acelerada).

Hay otros cuadros frecuentes en la fase III pero no tan claramente derivados de manera directa de la HTA, estos son:

1. Corazón: Angina pectoris; infarto agudo del miocardio (IMA).
2. Encéfalo: Trombosis arterial intracraneana.
3. Vasos sanguíneos: Aneurisma disecante, arteriopatía oclusiva.
4. Riñón: Insuficiencia renal.

### **3.- Clasificación según la etiología**

A.- Primaria

B.- Secundaria

#### **A.- Hipertensión arterial primaria**

Con el término HTA primaria, idiopática o esencial se conoce a aquella HTA de la cual no se conoce la causa orgánica evidente que esté dando origen a la patología. Recientemente la OMS está considerando que se han acumulado suficientes conocimientos sobre las causas de la HTA, lo cual justificaría abandonar el término de esencial y utilizar mejor el de primaria (Oparil S, 1992).

La etiopatogenia no se conoce aún pero los distintos estudios indican que los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la HTA primaria (Oparil S, 1992).

Algunos de los factores que han sido implicados en el desarrollo de la hipertensión primaria son:

1. Factores genéticos.
2. Factores alimenticios.
3. Factores ambientales.
4. Factores psicosociales.
5. Síndrome por estrés.
6. Iones de sodio-potasio y la ATPasa.
7. Desequilibrio en la relación GMPc - AMPc.
8. Sistema renina-angiotensina-aldosterona.
9. Prostaglandinas.
10. Sistema kalicreína - Cinina.
11. Metabolismo de los glúcidos.
12. Endotelinas

Otros factores:

- Sedentarismo.

- Tabaquismo.

### ***B.- Hipertensión Arterial Secundaria***

Es la hipertensión de causa conocida, es importante diagnosticarla porque en algunos casos pueden curarse con cirugía o con tratamiento médico específico (Oparil S, 1998).

Las causas más frecuentes de hipertensión secundaria son:

1. - Renales
- 2.- Endócrinas
- 3.- HTA por embarazo.
- 4.- Coartación de la aorta.
- 5.- Trastornos neurológicos.
- 6.- Fármacos y sustancias químicas.
- 7.- Tóxicas

## ***1.3.- Radicales libres de oxígeno***

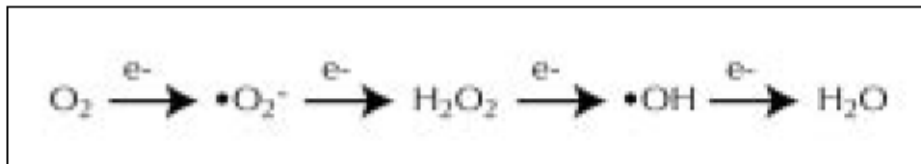
### ***1.3.1.- Introducción***

El balance oxidativo del organismo humano es esencial para la regulación metabólica, la producción de energía, la activación o inactivación de biomoléculas, la transducción de señales, el recambio celular y el control del tono vascular entre otros. Si el balance entre los sistemas oxidantes (generador de especies reactivas) y los antioxidantes (preventivo, secuestrador y reparador) se desequilibra a favor de los primeros, ya sea por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), por el debilitamiento de los sistemas antioxidantes o por ambas causas, se estará en presencia de lo que se conoce como estrés oxidativo (Touyz RM, 2000). La hipertensión arterial causada por angiotensina depende en gran medida en la producción de ROS (Touyz RM, 2000; Laursen JB y Rajagopalan S, 1997).

Las ROS incluyen a las moléculas derivadas del oxígeno con una elevada reactividad; los radicales libres son especies químicas, muy inestables que tienen en su estructura uno o más electrones no apareados y se caracterizan por su elevada reactividad y capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena. Las especies reactivas de oxígeno se generan como intermediarios en el proceso redox.

Las ROS más comunes y de mayor importancia biológica son: oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), peroxilo ( $\text{RO}^\bullet$ ), radical anión súper óxido ( $\text{O}_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); la reducción univalente y subsecuente del oxígeno origina estas especies (Esquema 2).

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) comprenden radicales libres y moléculas derivadas del nitrógeno, tales como óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Existen diferentes procesos endógenos generadores de especies reactivas, tales como: la respiración mitocondrial ( $\text{O}_2^-$ ), la activación de polimorfonucleados ( $\text{HOCl}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\bullet$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y el metabolismo del ácido araquidónico ( $\text{O}_2^-$ ) entre otros. Otras especies reactivas se forman en el organismo humano solo por la acción de factores externos, entre los cuales se encuentran la contaminación ambiental, las radiaciones, los hábitos tóxicos (alcohol, tabaco y estupefacientes), la alimentación inadecuada, la exposición a sustancias tóxicas (fertilizantes y plaguicidas) el metabolismo de algunos fármacos y un elevado estrés físico o mental.



**Esquema 2-** Reducción univalente de oxígeno (Tomado de: Touyz R 2000)

## ***1.3.2 Características de las distintas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno***

### ***1.3.2.1.- OZONO***

La luz ultravioleta y las descargas eléctricas rompen los dos enlaces covalentes en la molécula del O<sub>2</sub> produciendo oxígeno atómico (O) que se combina inmediatamente con el O<sub>2</sub> para producir ozono (O<sub>3</sub>). El O<sub>3</sub> es un gas irritante, de olor penetrante. Es mucho más oxidante que el O<sub>2</sub> pues reacciona con proteínas, lípidos, NAD(P)H, ascorbato, y ácido úrico, también genera otras especies reactivas. En soluciones ácidas es uno de los compuestos más reactivos. A una concentración de 0.5 ppm causa inflamación y muerte celular en los bronquios y los alvéolos pulmonares (Droge W, 2002).

### ***1.3.2.2.- OXÍGENO EN SINGULETE***

El O<sub>2</sub> es un dirradical, esto es, tiene dos electrones libres o desapareados. Estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interactuar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Esta es la razón por la cual el O<sub>2</sub> no es muy reactivo. El oxígeno en singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando esto sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Por eso hay dos especies de oxígeno singulete, uno que tiene los dos electrones desapareados pero con giros opuestos y el otro en el que estos electrones se han apareado. El primero decae muy rápido y para la biología solo tiene importancia el segundo. El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> también se forma en la dismutación espontánea del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de los ácidos hipohalogenosos. También los lipoperóxidos, generados por algunos radicales, pueden liberar <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas y el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce (Llédias F y Rangel P, 1998).

### ***1.3.2.3.- RADICAL SUPERÓXIDO.***

El radical superóxido ( $O_2^-$ ) se forma cuando el oxígeno capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasa por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por  $O_2$ . Esto ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). La ubiquinona puede aceptar con facilidad uno o dos electrones y cederlos al  $O_2$ . Además de la mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplasmático y de la membrana nuclear también pueden generar  $O_2^-$ . Los citocromos P450, una superfamilia de proteínas capaces de hidroxilar una gran variedad de xenobióticos, pueden generar  $O_2^-$ . Algunas oxidasas como la NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidasas inespecíficas también producen  $O_2^-$ .

Contrario a lo que generalmente se piensa, el  $O_2^-$  es poco reactivo. Solo reacciona a una tasa importante con las quininas, los fenoles, con el hierro libre o unido a algunas proteínas, por ejemplo los centros (Fe-S) y también con otros radicales (el propio  $O_2^-$ , el óxido nítrico y los radicales fenoxi). La dismutación espontánea de  $O_2^-$  ocurre solo cuando uno de los  $O_2^-$  se protona para formar radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio.

El  $O_2^-$  inhibe a algunas enzimas como la deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa lo que afecta la reducción del  $NAD^+$  y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, la deshidratasa del dihidroxiácido, la reductasa de ribonucleótido que genera los difosfatos de desoxirribonucleósidos para la síntesis del ADN, y una fosfatasa de proteína, la calcineurina importante en la transducción de señales. El  $O_2^-$  reduce  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ , reacciona con el ascorbato ( $10M^{-1} s^{-1}$ ) pero no reacciona con NADPH, con el ADN, con los lípidos, ni con los aminoácidos de las proteínas (Droge W, 2002).

La mayoría de los metales de transición contienen electrones desapareados. Por eso, muchos de los iones de los metales de transición son radicales y pueden participar donando o aceptando electrones. Así el  $Fe^{2+}$  en solución cede un electrón al  $O_2$  formando  $Fe^{3+}$  y  $O_2^-$ , por el contrario, el  $Cu^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$  aceptan un electrón del  $O_2^-$  con lo cual catalizan la dismutación del mismo. En la célula el hierro y el cobre pueden

catalizar la autooxidación de compuestos como el NAD(P)H, el ascorbato, los tioles, las pteridinas reducidas y otros compuestos. La toxicidad del  $O_2^-$  y del  $H_2O_2$  depende en gran medida de la disponibilidad y la distribución de estos metales de transición.

#### ***1.3.2.4.- PERÓXIDO DE HIDRÓGENO***

La mayor parte del  $H_2O_2$  o agua oxigenada proviene de la dismutación del  $O_2^-$ , sin embargo oxidasas tales como la de la xantina, la de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles también lo producen. La concentración de  $H_2O_2$  en las células varía mucho dependiendo del organismo y del tejido y va desde pico o nanomolar hasta cerca de 100  $\mu$ M.

El  $H_2O_2$  es poco reactivo y puede difundir a través de los compartimientos celulares aunque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. No reacciona con compuestos como el NAD(P)H, el ADN, los lípidos o la mayoría de las proteínas, inclusive a concentraciones milimolares. El  $H_2O_2$  es tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 $\mu$ M

#### ***1.3.2.5.- RADICAL HIDRÓXILO***

Tanto el  $O_2^-$  como el  $H_2O_2$  son compuestos que reaccionan poco. Sin embargo, ambos son tóxicos principalmente porque generan  $^1O_2$  y  $HO^\bullet$ . Cuando el  $H_2O_2$  acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^+$  entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ) y el ión hidroxilo  $HO^-$  (Reacción de fenton). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio, el  $HO^\bullet$  es uno de los compuestos más reactivos que existen. El  $HO^\bullet$  casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio donde se produce (Droge W, 2002).

#### ***1.3.2.6.- ÓXIDO NÍTRICO***

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular, da origen a una vasodilatación directa. El agente que desencadena este proceso fue en un principio conocido como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF), descubierto por Furchgott y Zawadzki en 1980 (Furchgott RF y Zawadzki JV, 1980). Este factor, es producido por la célula endotelial como consecuencia de estímulos

fisiológicos y químicos que *in vivo* pueden ejercer la acetilcolina y/o la bradicinina sobre sus respectivos receptores en la pared endotelial. Los experimentos decisivos que permitieron identificar al EDRF como óxido nítrico (NO) fueron llevados a cabo de forma independiente por Ignarro, por Furchgott, y por Salvador Moncada. Los tres investigadores descubrieron que tanto el NO como el EDRF compartían características comunes que apuntaban a una única identidad (Moncada S *et al*, 1991).

El óxido nítrico (NO) es un gas con las propiedades de los radicales libres, que actúa como una molécula mensajera de gran inestabilidad y vida corta, difunde por cualquier punto de la membrana de la célula productora, para actuar intercelularmente sin requerir ningún tipo de transportador de membrana. En el caso de que la diana sea la célula muscular lisa que forma la pared vascular, estimula en ella, a la guanilato ciclasa soluble para catalizar la síntesis del guanosin monofosfato cíclico (GMPc) (Murad F *et al*, 1990) y con ello inducir definitivamente la relajación muscular y por ende, la vasodilatación, regulando el flujo y la presión sanguínea (Moncada S *et al*, 1989; Vanhoutte PM, 1989; Luscher TF, 1991).

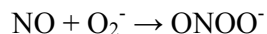
El NO es moderadamente soluble en el agua, siendo mucho más soluble en solventes no polares como el N-hexano, tendiendo a disolverse de manera selectiva en las membranas y en las fases lipídicas de las células por ser altamente lipofílico. Usando microsensores no selectivos para NO, se han demostrado concentraciones altas de NO en zonas adyacentes a la membrana plasmática de una célula endotelial productora de NO. La constante de difusión del NO en agua es generalmente del rango de  $2-4 \times 10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , valor que se aumenta significativamente con la temperatura. Se ha calculado que la difusión detectada mediante microsensores en condiciones fisiológicas idóneas a 37°C corresponde a  $3,3 \times 10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ . En base a estos cálculos, podemos señalar, en procesos de difusión simulada del NO, que esta molécula puede perfundir sorprendentemente a largas distancias desde las células que la producen hasta el punto de interacción con las células dianas (Lancaster JR, 1994).

El NO es una molécula no cargada que actúa como un radical libre, ya que de sus 11 electrones de valencia uno no está apareado, siendo esta molécula paramagnética, lo cual es una propiedad importante entre sus características químicas. Entre las interacciones químicas más comunes del NO en los sistemas biológicos destaca la



estabilidad que alcanza el electrón no apareado con otras especies paramagnéticas - oxígeno, superóxido, radicales peróxidos- o la formación de complejos entre el NO y un metal, dando origen en la mayoría de los casos a especies diamagnéticas estabilizadas en las que el electrón no apareado está compartido entre el NO y el metal.

El NO reacciona de manera muy rápida con el superóxido para producir inicialmente el peroxinitrito:



Este anión es altamente oxidativo, capaz de oxidar tioles y las bases del DNA, además de iniciar la peroxidación de lípidos independiente de la presencia de metales. En presencia de ciertos metales, el peroxinitrito permite formar especies tales como  $\text{NO}_2^+$ , las cuales pueden nitrar compuestos fenólicos, incluyendo los anillos aromáticos de las proteínas (Ischiropoulos H *et al*, 1992; Beckman JS *et al*, 1992)

En condiciones fisiológicas, el conjugado ácido del peroxinitrito, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ,  $\text{pK}_a = 6,8$  a  $25^\circ\text{C}$ ) es altamente reactivo y posee la reactividad de los radicales hidroxilos (Prior WA y Squadrito GL, 1995).

La ruptura homolítica del  $\text{ONOOH}$  genera el radical reactivo  $\cdot\text{NO}_2$ , el cual puede contribuir también a la toxicidad del ácido peroxinitroso (Zhu L *et al*, 1992). Sin embargo, alguna proporción de  $\text{ONOOH}$  se desprotona espontáneamente para formar el anión nitrato que es no reactivo (Crow JP *et al*, 1994).

El NO también reacciona con el radical peroxilo. Esta reacción puede ser vista como una actividad antioxidante del NO, donde las reacciones en cadena de los radicales lipídicos son terminadas por la reacción del NO con los radicales alcóxil y peróxil.

Otro potencial efecto antioxidante del NO es su reacción con el propio peroxinitrito (RubboH, RadiR. *et al*, 1994).

En las células de los mamíferos la vida media del NO es relativamente corta (5-10 s) (Ignarro LJ *et al*, 1993) y la máxima concentración del NO está en rangos micromolares.

El NO es producido por una familia de enzimas que se denominan sintasas del óxido nítrico (NOS). Se ha clasificado a las NOS en al menos dos isoformas, una de las cuales es constitutiva (cNOS) y la otra inducible (iNOS). Con la denominación cNOS identificamos a la vez a dos isoformas; una denominada endotelial (eNOS), por estar mayoritariamente presente en las células endoteliales de la pared de los vasos (Moncada S *et al*, 1991; Myers PR *et al*, 1990), esta isoforma también se le ha clasificado como NOS III. La otra NOS constitutiva ha sido denominada neuronal (nNOS) por encontrarse preferentemente en el cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico, reconociéndose también como NOS I. Finalmente, la isoforma de la NOS inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios se la conoce como iNOS y también, como en el caso de las anteriores, se ha clasificado como NOS II. La presencia de las diferentes isoformas de la enzima NOS ha sido identificada en numerosos tejidos de mamíferos (Moncada S *et al*, 1991; Rodrigo J *et al*, 1998; Esteban FJ *et al*, 1998), peces (Esteban FJ *et al*, 1998) e invertebrados (Elphick MR y Green IC, 1993; Elphick MR y Riveros Moreno V, 1993; Gelperin A *et al*, 1994).

La localización cromosómica de los genes de las diferentes isoformas de la NOS ha sido determinada mediante *Southern blotting*, usando el cDNA específico de cada isoenzima e hibridando líneas celulares humanas, de rata y ratón. Estos genes forman una familia que se encuentra dispersa en tres cromosomas. El gen de la isoforma nNOS (160 Kb) aparece localizado en el cromosoma 12 humano (12q 24.2) (Kishimoto J *et al*, 1992; Xu W *et al*, 1993), el gen de la isoforma de la eNOS (21-22 Kb, 26 exones) corresponde al cromosoma 7 (Xu W *et al*, 1994) y finalmente, el gen de la isoforma iNOS (37 Kb, 26 exones) se localiza en el cromosoma 17, estando situados en este caso los genes a cada lado del centrómero (17cen-17q 11.2) (Xu W *et al*, 1994; Moncada S *et al*, 1997).

La actividad de las NOS ha sido detectada en varios órganos y tejidos tales como el tracto digestivo, timo, piel, músculo esquelético, riñón, corazón y arterias (Salter M *et al*, 1991). Las tres isoformas participan en la conversión del sustrato L-arginina en L-citrulina y producen equimolarmente NO, siendo su actividad dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. En la célula endotelial la actividad de la isoforma eNOS depende de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  libre que modula así la síntesis del NO y por lo tanto el tono vascular.

Las isoformas neuronal y endotelial de la NOS, aunque tienen propiedades similares, muestran claras diferencias, ya que su localización en las células que las contienen es distinta. Es citosólica para la isoforma nNOS mientras que la eNOS está asociada a la membrana. (Forstermann U *et al*, 1991; Mitchell JA *et al*, 1991). Esta última, al contener un sitio de miristoilación en su extremo N-terminal (Pollock JS *et al*, 1991), facilita su anclaje a la membrana mediante el ácido mirístico. Por esta razón, se le reconoce también con el nombre de particulada (Sessa WC, 1994; Marletta MA, 1993; Griffith OW y Stuehr DJ, 1995). No obstante, se ha demostrado, por mutagénesis en el sitio de miristoilación, que podría existir una eNOS también citosólica (Sessa WC *et al*, 1993). En este sentido es probable que las eNOS, tanto la soluble como la particulada, sean un mismo producto génico. Busconi y Mitchell (Busconi L y Mitchell T, 1993) demostraron que la isoforma eNOS era también palmitoilada, que es una condición fuertemente relacionada con la condición de estar asociada a la membrana, sugiriéndose que la miristoilación era necesaria, pero no, suficiente para su anclaje a la membrana y que el hecho de ser palmitoilada reversiblemente podría controlar esta asociación. Las diferencias entre la nNOS y la eNOS también han sido demostradas a través de su inmunorreactividad, ya que estas isoformas reaccionan específicamente con anticuerpos específicos poli y monoclonales desarrollados para su reconocimiento (Springall DR *et al*, 1992).

La isoforma nNOS ha sido localizada fundamentalmente en las células nerviosas y se ha demostrado que se presenta en altas concentraciones en el cerebelo, hipotálamo, cerebro medio, estriado e hipocampo, y en bajas concentraciones en la médula oblongada (Forstermann U *et al*, 1990). La isoforma nNOS fue purificada del cerebelo de rata (Bredt DS y Snyder SH, 1990; Knowles RG *et al*, 1990) y clonada en el cerebro de rata (Stuehr DJ y Griffith OW, 1992) y humano (Bredt DS y Snyder SH, 1989). La isoforma nNOS ha sido descrita como un homodímero soluble de 155 kDa (Bredt D y Snyder SH, 1990; Schmidt HW y Murad F, 1991) mostrando una homología con el citocromo P450 reductasa (Bredt DS *et al*, 1991). La isoforma eNOS muestra un tamaño de 135 kDa (Pollock JS *et al* 1991). Estas isoformas de la enzima cNOS, tienen zonas de reconocimiento para NADPH, FAD, FMN, calmodulina y para el grupo hemo (hierro protoporfirina IX) (Stuehr DJ y Griffith OW 1992; Bredt DS *et al*, 1991). Todo ello hace que estas isoformas tengan semejanza con la familia de las hemoproteínas monooxigenasas y con las enzimas que actúan en el citocromo P450 (Marletta

MA,1993; Xu W *et al*, 1994; Griffith OW y Stuerh DJ, 1995). Las isoformas cNOS son totalmente dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina, actuando sobre la L-arginina, NADPH y el oxígeno molecular como sustratos y utilizando como cofactores los FAD y FMN (Moncada S *et al*, 1991; Bredt DS y Snyder SH, 1990; KnowlesRG *et al*, 1990; Bredt DS y Snyder SH, 1989; Garthwaite J, 1991). Su actividad enzimática puede controlarse por fosforilización (Nakane M *et al*, 1991), la cual se incrementa por otro cofactor, la tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) (Giovannelli J *et al*, 1991).

La iNOS ha sido detectada en el citosol de macrófagos (Hevel JM *et al*, 1991; Yui Y *et al*, 1991; Lyons CR *et al* 1996) mostrando una conformación dimerica y masa molecular de 135 kDa. Sin embargo, existen reportes de isoformas de iNOS de mayor peso molecular (200kDa) las cuales han sido identificadas en plaquetas (Chen LY y Mehta JL, 1996). La iNOS también ha sido localizada en hepatocitos, células tumorales, neutrófilos, células plasmáticas, linfocitos, células mesangiales, células endoteliales y células musculares lisas de la pared vascular (Moncada S *et al*, 1991; Wright CD *et al*, 1989). La expresión de la isoforma iNOS es estimulada en presencia de lipopolisacáridos (endotoxinas) y citocinas proinflamatorias (Salter M *et al*, 1991). También la isoforma iNOS puede expresarse en las células nerviosas de la corteza cerebral de ratas que han sido sometidas a hipoxia y privación de glucosa (Moro MA *et al*, 1998), o de cerebros que han sufrido una agresión isquémica intensa y permanente durante la edad adulta o durante el parto (Rodrigo J *et al* 1998), o en ratas sometidas a estrés crónico (Olivenza R *et al*, 2000); para su completa actividad la enzima requiere NADPH, FAD y FMN y en cierta medida  $\text{BH}_4$  y glutatión (Hevel JM *et al*, 1991), no necesitando, a diferencia de las isoformas cNOS,  $\text{Ca}^{2+}$  ni calmodulina adicional para la síntesis de NO.

Como caso especial se ha señalado que las células endoteliales presentan una NOS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y otra NOS independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; siendo por esta circunstancia el primer ejemplo de un tipo celular que puede poseer a la vez los dos tipos de NOS, la constitutiva y la inducible, lo que justificaría que en los cultivos de células endoteliales de cerebro de ratón se puedan producir grandes cantidades del NO después de ser activadas con el interferón- $\gamma$ , en combinación con cualquier inmunoactivador (Gross BB *et al*, 1991).

En el sistema cardiovascular las tres isoformas de NOS tienen implicaciones en su fisiología y fisiopatología. La eNOS es importante en la regulación vascular, manteniendo una vasodilatación adecuada y protegiendo a la íntima de los agregados plaquetarios y de la adhesión leucocitaria, además de inhibir la proliferación del músculo liso de la pared. La isoforma nNOS del sistema nervioso central y periférico puede también contribuir a regular la presión sanguínea. En las enfermedades asociadas a hipercolesterolemia, diabetes e hipertensión, que están caracterizadas por una disfunción endotelial, esta reducida la capacidad de vasodilatación mediada por el endotelio. El estrés oxidativo y la inactivación del NO por los aniones superóxido desempeñan un papel importante en estos estados patológicos. La administración de L-arginina como sustrato de NOS o BH<sub>4</sub> como cofactor, se ha descrito (Gross BB *et al*, 1991), pueden aliviar la disfunción endotelial en varias de estas condiciones. En las lesiones cerebrovasculares, las isoformas nNOS y la iNOS desempeñan un papel clave en la neurodegeneración, mientras que la eNOS tiene importancia para el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral y la prevención del daño neuronal. En la sepsis, las endotoxinas bacterianas y/o la citocinas proinflamatorias, inducen la expresión de iNOS en la pared vascular lo que origina la producción de grandes cantidades de NO que actúa como un mediador en la vasodilatación arteriolar inducida por endotoxinas y el choque séptico (Gross BB *et al*, 1991).

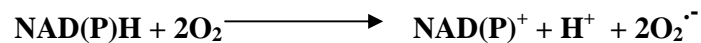
En la síntesis de NO por la acción de la NOS en células de mamíferos intervienen 5 electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1,5 moles de NADPH y 2 de dióxígeno por cada mol de NO formado. La reacción requiere además BH<sub>4</sub>, FAD, FMN, iones Ca<sup>2+</sup>, calmodulina y grupo hemo como cofactores. La reacción consiste en dos pasos separados de monooxigenación, consistiendo el primer paso en la incorporación de un átomo de O<sub>2</sub> al sustrato, a la vez que otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose la N-hidroxi-L-arginina como producto intermedio. El segundo paso cuenta con que un electrón de la NADPH, otro de la N-hidroxi-L-arginina y el O<sub>2</sub> en forma de dióxígeno-hierro atacan al carbono guanidino de la N-hidroxi-L-arginina, facilitando la incorporación de O<sub>2</sub> y la ruptura de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y dando lugar a L-citrulina. Además, en esta segunda reacción un átomo de O<sub>2</sub> se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el NO.

En las células de los mamíferos, existen muchas fuentes enzimáticas que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en especial  $O_2^{\cdot-}$ , estas incluyen: la respiración mitocondrial, citocromo P450, xantina oxidasa, NADH/NADPH oxidasa, sintasa del óxido nítrico (NOS), peroxidasa y otras hemoproteínas. Tres de estas enzimas han sido estudiadas extensamente en el sistema cardiovascular estas incluyen: NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa y sintasa del óxido nítrico.

### **1.3.3.- FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO**

#### **1.3.3.1.- NADPH OXIDASA**

La oxidasa de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) es la principal fuente de ROS en células vasculares. La NADPH oxidasa del sistema cardiovascular es una enzima asociada a la membrana que cataliza la reducción del oxígeno molecular usando un electrón donado por la NADH ó NAD(P)H (Griendling KK *et al*, 2000).



Después de la estimulación por diversos agentes, el  $O_2^{\cdot-}$  se produce en minutos u horas en la célula endotelial o en las células del músculo liso vascular (Griendling KK *et al*, 1994; Cai H y Harrison CH, 2000). Uno de los atributos más importantes de la oxidasa cardiovascular es la respuesta que tiene a hormonas, sustancias vasoactivas como la angiotensina II, trombina, PDGF y  $\text{TNF}\alpha$ , fuerzas hemodinámicas y cambios metabólicos locales. La NAD(P)H oxidasa vascular comprende cuando menos cuatro componentes: los asociados a la membrana celular p22phox, y gp9phox, o sus homólogos gp91phox (nox2), nox 1 y nox 4, y las subunidades citosólicas, p47phox y p67phox. (Lassegue B y Clempus RE, 2003 y Touyz RM y Tabet F 2003).

Varios estudios plantean que la estimulación del receptor  $\text{AT}_1$  por angiotensina II en células de músculo liso vascular estimula la producción de  $O_2^{\cdot-}$  a través de la NADPH oxidasa ya que la estimulación de este receptor activa a la enzima fosfolipasa C (PLC), por la subunidad alfa de la proteína G ( $G\alpha$ ) (Lassegue B y Clempus R, 2003; Landmesser U y Cai H, 2002). La PLC produce inositol trifosfato y ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DG). El  $\text{IP}_3$  libera calcio de las reservas intracelulares y el DAG contribuye a la activación de la proteína cinasa C (PKC), la cual fosforila a la subunidad

p47phox de la NAD(P)H oxidasa, activando así a la enzima y liberando  $O_2^-$  a los compartimentos intracelulares. Estudios *in vitro* sugieren que la subunidad p47 phox es muy importante en la producción de  $O_2^-$  en células de músculo liso que han sido estimuladas por angiotensina II (Griendling KK *et al*, 1994; Zhang H y Schmeisser A, 1999; Lavigne MC y Malech HL 2001; Schieffer B y Luchtefeld M, 2000). Diversos estudios han demostrado el papel que desempeña la NADH/NADPH oxidasa en la hipertensión inducida por angiotensina II. En un cultivo de células de músculo liso vascular de rata, la angiotensina II es capaz de estimular la generación de  $O_2^-$  aumentando la actividad de la NADH/NADPH oxidasa (Griendling KK *et al*, 1994). En ratas infundidas crónicamente con angiotensina II, la producción vascular de  $O_2^-$  se aumenta dramáticamente por la actividad de la NADH/NADPH oxidasa (Rajagopalan S y Kurz S, 1996). La presión arterial y la reactividad vascular se restaura en estas ratas administrando exógenamente liposomas encapsulados de superóxido dismutasa (SOD) (Laursen JB y Rajagopalan S, 1997). Otros estudios han demostrado que en la hipertensión inducida por angiotensina II, existe un aumento en la expresión del RNAm de otra subunidad de la NADPH oxidasa: la p22phox (Fukui T y Ishizaka N, 1997). Todas estas evidencias hacen responsables a la activación de la NADH /NADPH oxidasa, en especial a las subunidades p47 phox y p22phox, de la producción excesiva de  $O_2^-$  en la enfermedad cardiovascular.

#### **1.3.3.2.- XANTINA OXIDASA**

La xantina oxido-reductasa es una molybdoenzima capaz de catalizar la oxidación de hipoxantina y xantina en el metabolismo de las purinas. La xantina oxido-reductasa existe en dos formas interconvertibles una como xantina deshidrogenasa y la otra como xantina oxidasa. La primera reduce  $NAD^+$  mientras que la segunda prefiere oxígeno molecular, formando  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . En las células endoteliales, la actividad y expresión de la xantina oxidasa se aumenta por interferón  $\gamma$  (Dupont GP y Huecksteadt T, 1992). Los primeros estudios realizados en ratas espontáneamente hipertensas sugieren que el  $O_2^-$  producido por la xantina oxidasa altera la biodisponibilidad del NO. En estos animales la administración de una forma recombinante de SOD disminuye dramáticamente la presión, mientras que el inhibidor de la xantina oxidasa, oxypurinol, también disminuye la presión lo que sugiere fuertemente que la xantina oxidasa

desempeña un papel muy importante en el desarrollo de hipertensión arterial generando  $O_2^-$  (Nakazono K y Watenebe N, 1991; Suzuki H y Swei A, 1995). Sin embargo, existen algunas dificultades técnicas para estudiar a la enzima, entre las que se puede mencionar la carencia de un ensayo sensible que permita identificar la actividad de la enzima en cantidades pequeñas de tejido, además de no estar disponible un anticuerpo contra la enzima que facilite la cuantificación de la expresión de la enzima (Suzuki H y Swei A, 1995).

#### ***1.3.3.3.- SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS)***

Una tercera enzima capaz de producir  $O_2^-$  es la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS). Esta enzima utiliza L-arginina como sustrato y requiere que la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) esté cerca del grupo hemo para producir NO. En ausencia del sustrato o  $BH_4$ , la eNOS produce  $O_2^-$ . (Pou S y Pou WS, 1992; Vasquez-Vivar y Kalyanaraman B, 1998; Heinzl B y John M, 1992). El mecanismo por el cual la eNOS está desacoplada no es muy claro todavía. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el peroxinitrito, producto de la reacción entre NO y  $O_2^-$ , puede oxidar a la  $BH_4$  y desacoplar a la eNOS *in vivo* con lo que no se forma el dímero de eNOS ya que la  $BH_4$  es la unión entre los dos monómeros (Bech-Laursen J y Somers M, 1994). La eNOS desacoplada en el endotelio produce estrés oxidativo y disfunción endotelial por 3 mecanismos principalmente:

- La producción enzimática de NO disminuye, permitiendo que los radicales libres ataquen otros blancos celulares (Moncada S *et al*, 1991).
- La enzima comienza a producir  $O_2^-$  contribuyendo al estrés oxidativo (Rubbo H *et al*, 1994).
- Cuando la eNOS está parcialmente desacoplada produce simultáneamente NO y  $O_2^-$ , bajo estas circunstancias la eNOS se convierte en un generador de peroxinitrito aumentando drásticamente el estrés oxidativo (Pryor WA y Squedrito GL, 1995).

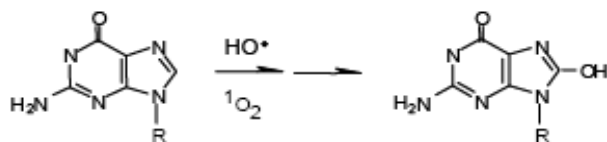


#### ***1.4.-DAÑO QUE CAUSAN LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y MECANISMOS DE REPARACIÓN.***

Los organismos poseen la habilidad de adaptarse rápidamente ante el estrés oxidativo. En general, un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir, posteriormente, condiciones más oxidantes sin sufrir daños irreversibles. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno que se producen en cualquier estado fisiológico, interactúan con el ADN, proteínas y lípidos causando daño en algunos casos.

##### ***1.4.1.- ADN.***

En condiciones normales en el ADN ocurre, a una tasa muy baja pero continúa, la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo, de la 5-metilcitosina en timidina y la ruptura de una o las dos hebras del ADN. Estas alteraciones se incrementan considerablemente con el estrés oxidativo (Marnett LJ y Plataras JP, 2001; Pleschke JM y Kleckzkowska HE, 2000) En muchas células se generan modificaciones en las bases del ADN cuando se les añade  $H_2O_2$ . Esto se debe en gran parte a los metales de transición, fundamentalmente  $Fe^{2+}$ , que se encuentran unidos al ADN y que en presencia de  $H_2O_2$  generan  $HO\cdot$  que modifica las bases del mismo. El  $HO\cdot$  puede atacar tanto a las purinas como a las pirimidinas, así como la desoxirribosa y además, generar rupturas en el ADN. El  $^1O_2$  es más selectivo y generalmente produce solo aductos de guanina, sobre todo la 8-hidroxi guanina (Esquema 3). La 8-hidroxi guanina también se puede generar a través de otras reacciones. En condiciones de estrés oxidativo las proteínas que normalmente están unidas al ADN pueden generar uniones covalentes con él, por ejemplo, una unión entre una tirosina y una timina. Asimismo, los lipoperoxidos pueden reaccionar con el ADN y modificarlo. El ADN de las mitocondrias y del cloroplasto también se modifica. De hecho, el ADN mitocondrial de los animales generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear.



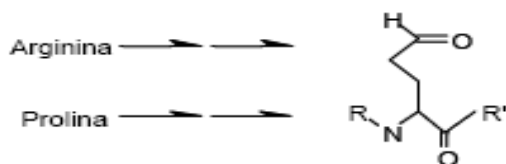
**Esquema 3.** Productos de oxidación en el ADN. La 8-hidroxiguanina es el principal producto de oxidación de las bases nitrogenadas especialmente con el  $^1O_2$  (Tomado de: Marnett LJ y Plataras JP, 2001).

Los cambios en las bases nitrogenadas pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN. Por ejemplo, la 8-hidroxiguanina puede hacer puentes de hidrógeno con una adenina en vez de con una citosina y la 8-hidroxiadenina con una guanina en vez de con una timina. Cuando hay rupturas en el ADN se activan las polimerasas de poli-ADP-ribosa (PARP) que unen residuos de ADP-ribosa formando cadenas ramificadas unidas a residuos de glutamato de la propia PARP y de algunas proteínas que están asociadas con el ADN (Pleschke JM y Kleczkowska HE, 2000).

#### **1.4.2.- PROTEÍNAS**

Las proteínas son las que llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares. Muchas proteínas son capaces de absorber una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. Sin embargo, es indudable que las consecuencias de las alteraciones en algunas funciones, por ejemplo la recepción y transmisión de señales, el transporte de iones, la duplicación y la reparación del ADN, las respuestas a condiciones de tensión y metabolismo energético, la transcripción y traducción pueden ser críticas para la célula. Algunas enzimas se inactivan o se activan con el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  cuando interaccionan con metioninas o cisteínas susceptibles. Estas reacciones son reversibles y por ello tienen importancia en la regulación de algunas actividades enzimáticas. La mayoría de los daños en las proteínas son ocasionados por el  $HO^\bullet$ ; este reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. El  $^1O_2$  es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína. También reaccionan con el grupo hemo de las catalasas de las células humanas (Davies MJ y Dean RT, 1997). El grado de oxidación de las proteínas de una célula se puede medir detectando carbonilos en la proteína total

purificada. Los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutámico y por rupturas de la cadena peptídica (Esquema 4).



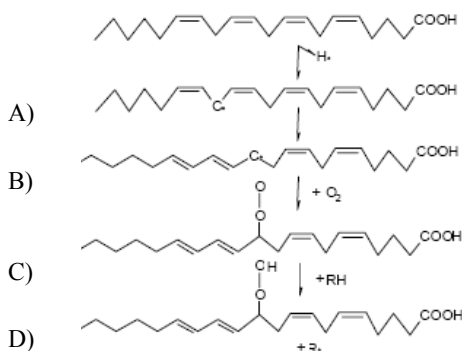
**Esquema 4.** Producto de oxidación de las proteínas. La prolina y la arginina generan el semialdehído de glutámico. El carbonilo que se forma se detecta por la formación de la base de Schiff ( Tomado de: Davies MJ y Dean R, 1997).

Los daños producidos por el HO<sup>•</sup> y el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación (Davies MJ y Dean 1997). En los eucariontes, la mayoría de las proteínas oxidadas se degradan en el citosol y sólo algunas en los lisosomas. El reconocimiento de los sitios oxidados, halogenados o la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteosoma. La ubiquitina es una proteína pequeña que se une covalentemente a las lisinas de las proteínas alteradas a través de un sistema de tres enzimas. La primera enzima utiliza ATP para activar el carboxilo terminal de la ubiquitina y unirlo a una de sus cisteínas, la segunda acarrea la ubiquitina y la tercera transfiere la ubiquitina al ε-amino de una lisina de la proteína alterada. Otro grupo de proteínas reconoce las proteínas ubiquitinadas y las lleva al proteosoma donde son degradadas (Davies MJ y Dean R, 1997).

### 1.4.3.- LÍPIDOS

Las membranas celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varias dobles ligaduras. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los ácidos grasos saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico). Las especies reactivas de oxígeno que pueden capturar estos hidrógenos son el HO<sup>•</sup>. Una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el O<sub>2</sub> para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo puede robar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción. Así una iniciación puede generar muchos

lipoperóxidos (Esquema 5). El  $^1\text{O}_2$  genera endoperóxidos con los ácidos grasos poliinsaturados que se descomponen en presencia de fierro formando radicales alcoxilo que contribuyen a la propagación de la lipoperoxidación. Los lipoperóxidos se pueden reducir mediante glutatión peroxidasa de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la acción de la fosfolipasa  $A_2$ , que aumenta su expresión y actividad durante el estrés oxidativo (Davies MJ y Dean RT, 1997).



**Esquema 5.** Oxidación de lípidos. A) La abstracción de un hidrógeno alílico genera un radical en un carbono. B) éste puede migrar, con lo cual hay un reacomodo de las dobles ligaduras y C) en presencia del dioxígeno se genera un radical peroxilo que D) se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido, con lo que se propaga la reacción (Tomado de: Davies MJ y Dean RT, 1997).

### 1.5- ESTRÉS OXIDATIVO E HIPERTENSIÓN.

Existen importantes evidencias clínicas que indican que las ROS juegan un papel fisiopatológico preponderante en el desarrollo de la hipertensión. Esto se debe, en gran medida al exceso de  $\text{O}_2^-$  y a la disminución en la biodisponibilidad de NO en el árbol vascular, en el riñón y al remodelado cardiovascular mediado por ROS (Touyz RM, 2003; Chabrashvili T *et al* 2002; Kishi T *et al* 2004).

En la hipertensión humana los marcadores biológicos del estrés oxidativo sistémico están elevados (Rendón J *et al* 2003). El tratamiento con superóxido dismutasa (SOD) u otros antioxidantes mejora las funciones vascular y renal, regresa el remodelado vascular y desciende la presión arterial (Rodríguez Iturbe B *et al* 2003; Viridis A *et al* 2004). Los modelos de ratones deficientes en enzimas generadores de ROS tienen presiones arteriales bajas en comparación con testigos normales y la infusión de angiotensina II no produce hipertensión en esos animales (Landmesser U *et al* 2002).

Más aún modelos experimentales con compromiso de la capacidad antioxidante desarrollan hipertensión (Tanito M *et al* 2004). En células de músculo liso vascular cultivadas y arterias aisladas de ratas hipertensas y de humanos la producción de ROS está aumentada, la señal redox-dependiente está amplificadas y la actividad antioxidante reducida (Touyz RM y Schiffrin EL, 2001). Por ende la evidencia en múltiples niveles avala el papel del estrés oxidativo en la patogenia de la hipertensión.

Las ROS vasculares se producen en el endotelio, adventicia y células de músculo liso vascular y derivan primariamente de la NAD(P)H oxidasa (Lassegue B y Clempus RE, 2003). Fisiológicamente las ROS se producen en forma controlada en bajas concentraciones y funcionan como moléculas de señal (Touyz RM y Tabet F, 2003) para mantener la integridad vascular regulando la función endotelial y la contracción-relajación vascular. En condiciones patológicas, el aumento de la actividad de las ROS conduce a disfunción endotelial, aumento de la contractilidad, crecimiento de músculo liso vascular, invasión de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación etc, todos estos factores son importantes en el daño vascular de la hipertensión (Diep QN *et al* 2002; Taniyama Y y Griendling KK, 2003).

El compromiso de la vasodilatación mediada por el endotelio en la hipertensión ha sido vinculada a la disminución en la biodisponibilidad del NO. Esta puede ser secundaria a la disminución en la síntesis o al aumento de la degradación del NO como consecuencia de la interacción del  $O_2^-$ , para formar peroxinitrito (Landmesser U *et al*, 2003).

El estrés oxidativo vascular ha sido demostrado en hipertensión espontánea (genética) y experimental. Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y las SHR-SP (proclives a accidentes cerebro vascular), modelos genéticos que desarrollan hipertensión espontáneamente, presentan incremento en el flujo de  $O_2^-$ , generado por NADPH en los vasos de resistencia (mesentéricos) y de conducción (aorta) (Rodríguez Iturbe B *et al* 2003; Tanito M *et al* 2004; Shokoji T *et al*, 2003). Esto se asocia con la sobreexpresión de subunidades de NAD(P)H oxidasa y con un aumento de la actividad de la misma (Kishi T *et al* 2004; Viridis A *et al* 2004; Shokoji T *et al*, 2003; Parravicini TM *et al* 2004). En ratas espontáneamente hipertensas se han podido identificar varios polimorfismos en el promotor del gen p22phox (Zalba G *et al* 2001); este hecho tiene

implicaciones clínicas, debido a que se ha descrito la asociación de este polimorfismo y la producción de  $O_2^-$ , mediada por la NAD(P)H oxidasa en la pared vascular de pacientes con hipertensión y aterosclerosis  $O_2^-$ , (Moreno MU *et al*, 2003). El aumento en la expresión de la subunidad p47phox se ha observado en los vasos del riñón, mácula densa y nefrón distal de ratas espontáneamente hipertensas jóvenes, hecho que sugiere que la sobre regulación de la NAD(P)H oxidasa renal precede al desarrollo de la hipertensión (Kishi T *et al* 2004; Fujii S y Zhang L, 2003). La disminución de la biodisponibilidad del NO es consecuencia del aumento en la generación vascular de  $O_2^-$  y la subregulación del sistema redox que también puede contribuir al estrés oxidativo en las ratas espontáneamente hipertensas y en la espontáneamente hipertensas propensas al accidente cerebro vascular (Touyz R.M, 2003; Tanito M *et al* 2004). Tomados en conjunto estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo en la hipertensión genética comprende el aumento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la disfunción de la sintasa del óxido nítrico endotelial (desacople de la eNOS), lo que es regulado en parte, por los receptores AT1.

El estrés oxidativo vascular también ha sido demostrado en hipertensión inducida experimentalmente, como es el caso de la mediada por AngII, la hipertensión Dahl salt-sensible, la inducida por plomo, la hipertensión relacionada con la obesidad, la hipertensión por mineralocorticoides y la provocada por aldosterona (Nishiyama A *et al*, 2004; Viridis A y Fritsch Neves M, 2002; Dobrian AD *et al* 2004). La activación de la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa vasculares y el desacople de la óxido nítrico sintasa endotelial han sido responsabilizados en la amplificación de la generación del  $O_2^-$  en la hipertensión experimental. La inhibición de la generación de ROS con adipocinina (inhibidor de la NAD(P)H oxidasa o con allopurinol (inhibidor de la xantino-oxidasa) y la depuración de radicales con antioxidantes o con enzimas antioxidantes simula al descenso de la presión arterial y evita el desarrollo de hipertensión en la mayoría de los modelos experimentales (Rodríguez Iturbe B *et al* 2003; Viridis A *et al* 2004; Shokoji T *et al*, 2003; Park JB y Touyz RM, 2002; Fujii S y Zhang L, 2003).

## ***1.6.- Enzimas antioxidantes.***

El daño que causan las especies reactivas de oxígeno es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y los mecanismos de recambio y reparación. Los mecanismos antioxidantes son muy diversos en cada organismo, célula o tejido y predominan algunos sobre otros. Hay compuestos antioxidantes con varias funciones, enzimas antioxidantes que mantienen en forma reducida dichos compuestos antioxidantes y enzimas que eliminan el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  evitando así la formación del  $O_2^-$ , y del  $HO\cdot$ . Aparte de los mecanismos antioxidantes específicos, muchos otros compuestos y enzimas contribuyen de diversas maneras a mantener el estado redox natural. La mayoría de las células tienen una batería de enzimas que desechan el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  y el  $NO$ . El  $O_2^-$  sólo puede atravesar las membranas celulares como  $HO_2^-$  o a través de poros iónicos. Es posible que debido a ello se requiera tener una dismutasa de superóxido (SOD) en cada compartimiento celular limitado por una membrana. El  $H_2O_2$  se produce principalmente por la dismutación del  $O_2^-$  pero también de muchas oxidasas que, tal vez por esa razón, se encuentran confinadas a vesículas, como los peroxisomas, glioxisomas, lisosomas, etc. Así, la concentración local de  $H_2O_2$  puede variar entre nanomolar y milimolar o incluso cerca de 0.5 molar, dependiendo del sitio de su producción y de la célula o el tejido (Miura H y Bosnjak JJ, 2003).

Se define como antioxidante a aquellas sustancias que, presentes a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene su oxidación. El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico.

Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear el daño producido por los radicales libres, entregando electrones que estabilizan y neutralizan sus efectos dañinos. Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas (Hasnain BI y Mooradian AD, 2004)

Los mecanismos enzimáticos antioxidantes pueden ser endógenos que incluyen a las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y la coenzima Q y los mecanismos antioxidantes exógenos, que ingresan al organismo por la vía de los alimentos. Cuando llegan a las células, se depositan en sus membranas y las protegen de la lipoperoxidación. Tal es el caso de las vitaminas E y C y del caroteno. A diferencia de los antioxidantes enzimáticos, estos otros reaccionan con los radicales libres y modifican su estructura, es decir, los capturan o neutralizan, y se oxidan en el proceso. Finalmente, algunos metales, como selenio, cobre, zinc y magnesio, que en ocasiones forman parte de la estructura molecular de las enzimas antioxidantes, también son fundamentales en este mecanismo de protección celular (Jialal I y Deveraj S, 2003)

### ***1.6.1.- Superóxido dismutasas.***

Las superóxido dismutasas son una familia de enzimas que, como su nombre lo indica, dismutan el  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$  y lo hacen de manera muy eficiente ( $10^9 M^{-1} s^{-1}$ ) independientemente del pH.



Hay varios tipos de dismutasas de superóxido: las enzimas que tienen  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en su sitio activo y que son intracelulares (SOD  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ ) las que son extracelulares (ECSOD), y las enzimas que tienen  $Mn^{2+}$  (MnSOD) en su sitio activo y que son citosólicas o de los organelos celulares.

Su actividad enzimática presenta repercusiones a nivel funcional. Entre ellas se pueden mencionar las siguientes:

a) Las SODs protegen contra la citotoxicidad mediada por el radical superóxido ya que, la reacción del NO con el superóxido produce peroxinitrito, un potente oxidante con la capacidad de producir citotoxicidad (Beckman JS *et al*, 1992). La evidencia sugiere que la formación de peroxinitrito incluye: nitración selectiva de residuos de tirosina en proteínas como prostaciclina sintasa (MacMillan-Crow LA y Cruthirds DL, 2001; Gou W y Adichi T, 2003; Cooke CL y Davidge ST, 2002), oxidación de tetrahidrobiopterina (Laursen JB y Somers M, 2001) y oxidación de complejos zinc-



tiolato en eNOS (Zou MH y Shi C, 2002). Los últimos dos efectos producen una eNOS desacoplada produciéndose más superóxido que NO.

b) El óxido nítrico reacciona con el anión superóxido 3 veces más rápido que la dismutación del superóxido por SOD. Debido a la eficiencia de esta reacción, la concentración local de SOD es determinante en la bioactividad (vida media biológica) del NO; por lo que una segunda función de SOD es proteger al NO (Beckman JS *et al* 1992; Darley-Usmar V y Wiseman H, 1995).

c) Una tercera consecuencia funcional de la actividad de SOD es la formación de peróxido de hidrógeno. Este es relativamente estable y difusible (a través de las membranas celulares), estas características lo hacen análogo al NO como una molécula señal, también es un regulador de la expresión génica y un importante mediador en la hipertrofia del músculo vascular en respuesta a diferentes estímulos como la angiotensina II (Griendling KK y Sorescu D, 2000; Blanc A y Pandey NR 2003). A su vez, este puede activar factores de transcripción (Sobey GC y Heistad DD, 1997; Matoba T y Shimokawa H, 2003; Miura H y Bosnjak JJ, 2003). En combinación con algunos metales de transición como hierro o cobre, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar para formar radical hidroxilo y producir daño celular por la vía de la reacción de Fenton.

### ***SOD Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>***

La SOD Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> es un homodímero, muy resistente a la desnaturalización, se inhibe con cianuro o con un quelante de cobre como el dietilditiocarbamato. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe a la enzima *in vitro*. En las mitocondrias la SOD Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> se encuentra en el espacio intermembranal y la MnSOD en la matriz. El Cu<sup>2+</sup> de la SOD Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>, está sostenido entre cuatro histidinas en un barril aplanado de ocho hojas-β plegadas antiparalelas y lleva a cabo la transferencia de electrones mientras que el Zn<sup>2+</sup> tiene un papel estabilizador. El canal que conduce al sitio activo tiene cargas negativas que repelen el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y lo conducen al interior que tiene cargas positivas.

Dentro de los vasos sanguíneos, la isoforma predominante de SOD es la SOD Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> (Stralin P y Marklund SL 1995; Fukai T y Siegfried MR 2000; Fukai T y Siegfried MR, 1999; Fukai T y Galis ZS, 1998). Por ejemplo, en una aorta de ratón normal, la

actividad de la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  es de alrededor del 53 al 80% de la actividad total de SOD mientras que MnSOD es de 2 al 7% de la actividad total de esta. Un patrón similar de actividad existe en arterias humanas (Starlin P y Karlsson K, 1995). Se ha sugerido que la liberación del óxido nítrico del endotelio depende en gran medida de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ , mientras que la actividad de la EC-SOD se necesita para proteger al óxido nítrico en su difusión a la pared vascular (Starlin P *et al*, 1995; Mugge A *et al*, 1991; Oury TD *et al*, 1996).

Debido a que la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  se considera que se expresa constitutivamente, los niveles de RNAm pueden ser regulados por varias condiciones fisiológicas. Los niveles de la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  se pueden elevar en respuesta a una amplia variedad de estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, el estrés por rozamiento, la radiación UV y X, metales pesados, peróxido de hidrógeno, ozono, óxido nítrico y ácido araquidónico entre otros.

Investigaciones recientes de *gen-blanco* en ratón muestran evidencia directa de la importancia funcional de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ . La deficiencia de esta enzima da como resultado un aumento en los niveles de la superóxido y el peroxinitrito vascular, aumentándose la respuesta vasoconstrictora y disminuyendo la relajación dependiente del endotelio en arterias largas de conductancia y microvasos (Didion SP y Ryan MJ 2002; Verareddy S y Cooke CL, 2004; Cooke CL y Davidge ST, 2003). La alteración en la expresión de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  puede tener un impacto en la estructura vascular; se ha reportado que la deficiencia de esta enzima produce hipertrofia en arteriolas cerebrales (Baumbach GL y Didion SP, 2003). Este descubrimiento dió la primera evidencia de que SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  inhibe normalmente la hipertrofia vascular y resalta la importancia de esta enzima en la vasculatura.

La expresión de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en las células vasculares puede variar bajo diversas condiciones. Por ejemplo, los niveles de la enzima son más altos en algunas arterias de hembras (Laughlin MH y Welshons WW, 2003) y puede aumentarse con la edad. Su expresión aumenta en el endotelio en respuesta a un aumento del estrés por rozamiento (Inoue N y Ramasamy S, 1996). La activación de los receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPARs) aumentan la expresión de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en el endotelio (Inoue I y Goto T, 2001). Por lo que el aumento en la expresión de esta enzima puede contribuir a un mecanismo protector en la vasculatura. Existen

evidencias obtenidas de trabajos recientes en ratones transgénicos que sugieren que la sobreexpresión de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  efectivamente evita un aumento en la producción de superóxido vascular y atenúa el aumento de la presión arterial en respuesta a angiotensina II (Suzuki K y Nakazato K, 2002; Uddin M y Yang H, 2003).

### ***ECSOD***

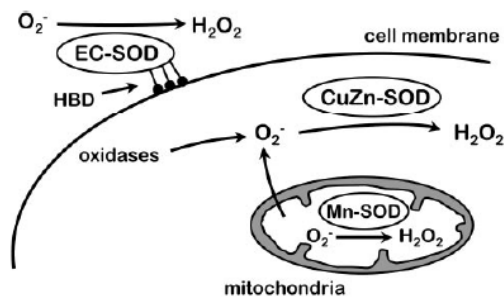
La ECSOD es un homotetrámero mucho más grande que las enzimas intracelulares. Es una glicoproteína que se une a la superficie celular por su dominio de unión a heparina que le da a la proteína afinidad por los proteoglicanos en las superficies celulares de las membranas y la matriz extracelular (Marklund SL 1984; Oury TD y Day BJ, 1996; Sansdrom J y Carlsson L 1992). La ECSOD se localiza en la pared vascular especialmente entre el endotelio y el músculo vascular (Stralin P y Karlsson K, 1995; Oury TD y Day BJ, 1996; Fykai T y Folz RJ, 2002). La mayor fuente de la enzima se encuentra en el músculo vascular (Stralin P y Karlsson K, 1995; Fykai T y Folz RJ, 2002; Zelko IN y Mariani TJ, 2002). El endotelio no produce ECSOD (Fykai T y Folz RJ, 2002). La expresión de ECSOD en las células vasculares y en la pared del vaso se altera en respuesta a una gran variedad de estímulos incluyendo: ejercicio, factores de crecimiento, citocinas, estímulos vasoactivos incluyendo angiotensina II, NO durante la hipertensión y diabetes (Fukai T y Galis ZS, 1998; Fukai T y Siegfried MR, 1999; Landmesser U y Merten R, 2000; Strain P y Marklund SL, 2001; Davis ME y Cai H, 2003). Basándonos en su localización extracelular, se ha sugerido que al menos una función de la ECSOD es proteger al NO cuando difunde del endotelio a su mayor blanco, la guanilato ciclasa soluble, en el músculo vascular (Oury TD y Day BJ, 1996; Wsolin MS 2000).

### ***MnSOD***

La MnSOD puede encontrarse como un homodímero o tetrámero, es susceptible de ser desnaturalizada con detergentes o solventes, no se inhibe con cianuro, dietilditiocarbamato, ni con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En los eucariontes se encuentra en las mitocondrias. Bajo condiciones normales, la cadena mitocondrial de transporte de electrones es la mayor fuente de superóxido, convirtiendo el 8% del oxígeno molecular a superóxido. Debido a su localización subcelular la MnSOD se considera la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. Esta conclusión se basa en el hecho de que

un ratón completamente deficiente en MnSOD muere pocas semanas después de haber nacido teniendo una variedad de fenotipos incluyendo neurodegeneración, anomalías cardíacas y daño mitocondrial extenso (Andresen J y Farici FM, 2004).

Se ha descrito que la angiotensina II aumenta los niveles de expresión de MnSOD pero disminuye su actividad debido a la nitración de la tirosina inducida por peroxinitrito (Gou W y Adachi T, 2003). Por lo que la importancia funcional de la MnSOD en la hipertensión inducida por angiotensina no es conocida y es difícil de predecir. La sobreexpresión de MnSOD empleando virus o liposomas produce efectos benéficos en muchos modelos de enfermedad vascular; la sobreexpresión de MnSOD reduce los niveles de superóxido y mejora la función endotelial en hipercolesterolemia, diabetes y modelos de hipertensión (Zanetti M y Sato J, 2001; Li L y Fink GD, 2003); así como también reduce la formación de especies reactivas de oxígeno en el endotelio en estos mismos modelos. (Nishikawa T y Edelstein D, 2000).



**Esquema 6-** Representación esquemática de la localización subcelular de las 3 diferentes isoformas de SOD.  $SOD^{Cu^{2+}/Zn^{2+}}$  localizada principalmente en el citosol, Manganese superóxido dismutasa (MnSOD) localizada en la mitocondrias, y SOD extracelular (ECSOD). Las 3 isoformas catalizan la misma reacción, produciendo  $H_2O_2$  del  $O_2^-$  HBD indica el dominio de unión a heparina (Tomado de: Zelco IN y Mariani TJ, 2000).

### 1.6.2.- Catalasa

Las catalasas dismutan el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$  y lo hacen con gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11. Son enzimas muy resistentes a agentes desnaturizantes y solventes orgánicos. Se inactivan con 3-amino-1,2,4-triazol y, como todas las hemoproteínas se inhiben con cianuro y azida (Díaz A y Rangel P, 2001). Las catalasas tienen un origen común y se encuentran desde las arqueas hasta los mamíferos. En términos generales su secuencia y estructura están conservadas. Son homotetrámeros u homodímeros de subunidades de 60KDa o de 80KDa. Hay varios subgrupos de catalasas: uno de plantas,

uno de animales, uno de hongos, dos de bacterias y uno de bacterias y hongos en donde se encuentran las catalasas grandes (Klotz MG y Klassen GR, 1997). Cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo b) o derivados del mismo, como el hemo *d* o una clorina (Lledías F y Hansberg W, 1998). El hemo por sí solo cataliza la dismutación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aunque con mucha menor eficiencia que la catalasa. El dominio del barril-β, que incluye la cavidad del hemo, los aminoácidos que lo orientan y el canal que conduce a él, es la parte más conservada de la molécula. (Bravo J y Gouuet P, 1997). Las catalasas monofuncionales tienen un canal estrecho que conduce a la parte distal del hemo en donde una histidina y una aspargina participan en la reacción junto con el Fe<sup>3+</sup> y el hemo. El Fe<sup>3+</sup> no tiene enlace de coordinación en la parte distal y en la parte proximal el enlace es con una tirosina muy conservada. El canal estrecho y la falta de coordinación del Fe<sup>3+</sup> en el lado distal tiene que ver en la selectividad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de estas enzimas, aunque también son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas, como metanol o etanol (actividad de peroxidasa). Al entrar un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al sitio activo toma un electrón del hierro y otro del hemo para generar una molécula de agua y el compuesto I, que consiste en un ferroxilo y un radical porfirínico catiónico. Una segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxígeno y otra de agua.

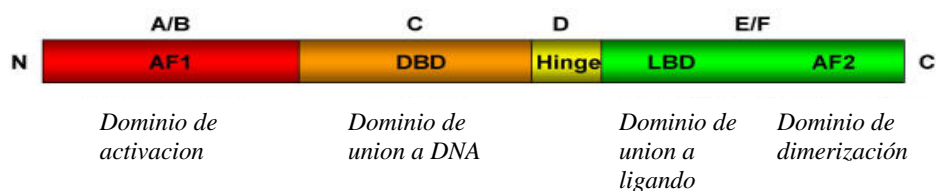
## ***1.7.-Receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPARs)***

### ***1.7.1 Definición***

Los receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPARs) son proteínas transductoras pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares la cual incluye receptores del ácido retinoico (RARs), receptores de la hormona tiroidea (TRs) y receptores esteroideos (Berger J 2002).

Los PPARs se identificaron en 1990 en roedores y se nombraron de esta manera por su propiedad de activar la proliferación peroxisomal. Los ácidos grasos y drogas hipolipemiantes como los fibratos son activadores de los PPARs. Los PPARs controlan la expresión de varios genes que son cruciales para el metabolismo de la glucosa y los lípidos. (Wahli W 1995). Los tres principales tipos de PPAR, están

codificados por genes separados y se han identificado como: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta/\beta$ . Las tres isoformas poseen características estructurales y funcionales similares. En estos receptores que activan la proliferación peroxisomal se han identificado 4 dominios llamados: A/B, C, D y E/F. El primer dominio A/B se encuentra en la región amino terminal, tiene una función de activación independiente del ligando (AF-1) (Werman A 1997) la cual es responsable de la fosforilación del PPAR. El segundo dominio de unión al DNA (DBD) o dominio C consiste en dos dedos de zinc que promueven la unión del PPAR a los elementos de respuesta de los receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPRE) en la región del promotor de los genes blanco (Kliwer SA 1992). El sitio D es el dominio de anclaje a cofactores. El dominio E o dominio de unión al ligando (LBD) está localizado en la región C-terminal media del receptor y está compuesto de 13  $\alpha$ -hélices y 4 pequeñas hojas  $\beta$ , es responsable de la especificidad del ligando y de la activación del sitio de unión del PPAR al PPRE, lo cual aumenta la expresión de genes blanco (Berger J 2002). La unión de cofactores para asistir el proceso de transcripción de genes se lleva a cabo por la activación del dominio E/F (AF-2) (Esquema 8) (Berger J 2002). Los PPARs forman heterodímeros con el receptor retinoico X (RXR); el RXR existe en tres diferentes isoformas: RXR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  las cuales se activan por el agonista endógeno ácido retinoico 9-cis (Mangelsdorf DJ 1992).



**Esquema 7-** Representación esquemática de los diferentes dominios de los receptores que activan la proliferación peroxisomal ( Tomado de: Berger J 2002).

Los PPAR $\alpha$  se expresan en numerosos tejidos como hígado, riñón, corazón, músculo esquelético y tejido adiposo café y además se expresan en un amplio rango de células vasculares como las endoteliales, células de músculo liso, monocitos y macrófagos. Por su parte los PPAR  $\beta/\delta$  se expresan en un amplio rango de tejidos y células con niveles relativamente más altos en cerebro, tejido adiposo y piel. Finalmente los PPAR $\gamma$  poseen 3 isoformas distintas llamadas PPAR $\gamma$ -1, PPAR $\gamma$ -2 y PPAR $\gamma$ -3 (Fajas L 2000). La expresión de estos PPAR depende del tejido, de esta manera: PPAR $\gamma$ -1 se encuentra en

un amplio rango de tejidos mientras que la expresión de los PPAR $\gamma$ -2 está restringida al tejido adiposo y los PPAR $\gamma$ -3 es abundante en macrófagos, intestino delgado y tejido adiposo blanco (Braissant O 1996).

### ***1.7.2.-PPREs***

Estructuralmente, los elementos de respuesta de los receptores que activan la proliferación peroxisomal (PPREs) consisten en dos hexanucleotidos con la secuencia AGGTCA (DR-1) separados por un nucleótido espaciador. El modelo DR-1 es específico para cada heterodímero PPAR-RXR, pudiéndose distinguir modelos distintos como DR-3 y DR-4 (Juge-Aubry C 1997; Lemberger T 1996).

### ***1.7.3.-Ligandos***

La secuencia de aminoácidos en el LBD de las 3 isoformas de los PPAR posee variantes y se piensa que brinda las bases moleculares para la selectividad del ligando; esto permite a los PPAR sensibilizarse con un amplio rango de sustancias endógenas, incluyendo ácidos grasos y sus metabolitos. Una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos, incluyendo químicos industriales, como herbicidas así como también agentes farmacéuticos sintéticos incluyendo fibratos (fenofibrato y clofibrato) y tiazolidinedionas han demostrado unirse y activar a los PPAR.

Muchos ácidos grasos son capaces de activar las 3 distintas formas de PPAR, sin embargo existe cierta preferencia por determinados ácidos grasos para cada PPAR (Tabla 1). Los ligandos naturales de los PPARs son los ácidos grasos y los derivados de los eicosanoides. Dentro de los ácidos grasos se incluyen al ácido linoléico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, etc. Los ácidos grasos y sus derivados, incluyendo el ácido 8-S-hidroxi-eicosatetraenoico, el ácido araquidónico, LTB<sub>4</sub> y los fibratos se cree que son potencialmente activadores del PPAR $\alpha$ . La prostaciclina, el ácido linoleico, y compuestos sintéticos incluyendo al L-165041 y GW2433 se ha demostrado que son ligandos selectivos para PPAR $\beta/\delta$ . Por otro lado, los ligandos naturales para PPAR $\gamma$  incluyen metabolitos oxidados del ácido linoleico y ácido 13-hidroxi-octadecadienoico; además, las tiazolidinedionas que incluyen a la rosiglitazona y pioglitazona son potentes agonistas selectivos para PPAR $\gamma$  (Kliwer SA 1997). El desarrollo y uso clínico de los ligandos de los PPAR, en nuestro tiempo ha

determinado que entendamos los papeles fisiológicos y patofisiológicos de los PPAR y las implicaciones terapéuticas en la modulación de estos receptores.

**Tabla 3**

<i>Ligandos exógenos de los PPARs</i>		<i>Ligandos endógenos de los PPARs</i>	
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>PPAR<math>\gamma</math></i>
WY-14,643	Indometacina	Acido Palmítico	Acido araquidónico
Clofibrato	Piroxicam	Acido Esteárico	Acido Eicosapentaenoico
Gemfibrozil	Ibuprofeno	Acido Palmitoleico	PGJ2
Nafenopino	Pioglitazona	Acido Oléico	15 deoxy PGJ12
Bezafibrato	Ciglitazona	Acido Linoléico	
	Englitazona	Acido Araquidónico	
	BRL-49653	Acido Eicosapentaenoico	

*Tabla 3- Ligandos exógenos y endógenos de los PPAR (Berger J 2002).*

#### **1.7.4.- Coactivadores/Correpresores**

Muchas proteínas actúan como coactivadores/correpresores, estas median la habilidad del receptor nuclear para iniciar o suprimir el proceso de transcripción. Los coactivadores/correpresores interactúan con el receptor nuclear de una manera dependiente del ligando. Cuando el ligando aún no se ha unido al receptor nuclear, este se encuentra heterodimerizado y generalmente se asocia con correpresores los cuales poseen actividad de deacetilación de histonas. Esta actividad del correpresor inhibe la transcripción (Chen JD 1995; Xu L 1999). Por otra parte, los coactivadores como la proteína de unión a PPAR (PBP) poseen actividad de acetilación de histonas con lo que se inicia una secuencia de eventos que induce el proceso de transcripción de genes después de la unión del ligando (Zhu Y 1997).

#### **1.7.5.-Mecanismo de acción**

La transcripción de genes es un mecanismo idéntico en todos los subtipos de PPARs y puede llevarse a cabo como un mecanismo clásico y no clásico (Aranda A 2001). En el primer caso el proceso de transcripción comienza con la unión del ligando (endógeno u exógeno) con lo que se altera la actividad transcripcional del receptor nuclear. La unión



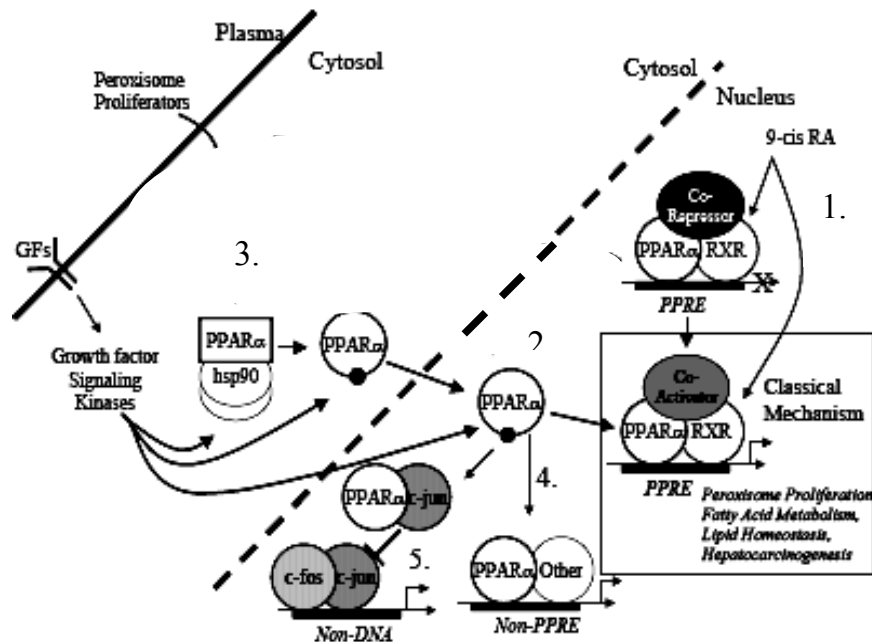
ligando-PPAR heterodimeriza con RXR y se lleva a cabo un cambio conformacional en el PPAR:RXR permitiendo así que el heterodímero se una a la región del promotor PPRE; en este proceso también se unen coactivadores (Aranda A 2001; Clarke S 1999). Esto da como resultado un aumento en la actividad de la transcripción de varios genes involucrados en diversos procesos biológicos. Sin embargo, existen otras variaciones del mecanismo:

1) El ligando interactúa con el PPAR que preexiste como un complejo con el DNA asociado con una proteína correpresora. La interacción con el ligando causa que se libere el correpresor y se asocie un coactivador resultando la estimulación para el proceso de transcripción (Aranda A 2001; Clarke S 1999) (Figura 8).

2) El ligando interactúa con el PPAR que se encuentra como un miembro soluble del núcleo. La unión del ligando da como resultado la heterodimerización con RXR, la unión al DNA y a un coactivador y el inicio de un mecanismo clásico (Aranda A 2001) (Figura 9).

3) En este escenario el PPAR se encuentra en el citosol, formando un complejo con Hsp90 u otra proteína chaperona. La unión del ligando causa un cambio conformacional y translocación al núcleo siguiéndose el proceso como un mecanismo clásico (Clarke S 1999). (Figura 8)

También existen vías no clásicas del mecanismo en donde, el PPAR es capaz de interactuar con el DNA y formar heterodímeros con receptores nucleares incluyendo el receptor tiroideo. La unión de este complejo al DNA se lleva a cabo en un sitio que no es PPRE. También los PPARs pueden participar en la regulación de la expresión de genes sin unirse al DNA, por asociación de estos a factores de transcripción como c-jun o p65 (Aranda A 2001).



Esquema 8- Mecanismo de acción clásico y no clásico de los PPARs. (Tomado de: Berger J 2002)

### 1.7.6.-PPAR $\alpha$

El gen de los PPAR $\alpha$  se encuentra en el brazo largo del cromosoma 22 (22q12-q13.1); se expresa en tejidos con una alta actividad en el metabolismo de los ácidos grasos, como el corazón, riñón, hígado, endotelio y células del músculo liso vascular sugiriendo que los activadores de los PPAR $\alpha$  ejercen un beneficio directo sobre la pared vascular. Los PPAR $\alpha$  pueden activarse por una gran variedad de ácidos grasos saturados e insaturados incluyendo: ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoléico y araquidónico que se unen al receptor con una afinidad micromolar. (Gottlicher M 1992; Kliwer SA 1997). Dentro de los ligandos exógenos de los PPAR $\alpha$  se encuentran los fibratos que son ácidos carboxílicos anfipáticos, el clofibrato es un prototipo de esta clase de ligandos, el cual induce la proliferación peroxisomal en roedores (Hess R 1965). Clofibrato y fenofibrato han demostrado ser 10 veces más selectivos para activar a PPAR $\alpha$  que a PPAR $\gamma$  (Willson TM 2000).

La activación de los PPAR $\alpha$  media efectos tales como el catabolismo de los ácidos grasos a través de la estimulación de la oxidación lipídica mitocondrial; controla en forma importante el metabolismo extracelular de los lípidos alterando los niveles de lipoproteínas e inhibe algunos mecanismos involucrados en los procesos inflamatorios

de la pared vascular. En el miocardio, los agonistas de los PPAR $\alpha$  incrementan la captación mitocondrial de ácidos grasos libres y por consiguiente su oxidación para la obtención de energía al estimular la palmitoiltransferasa I (Schiffrin E y Amiri P, 2003; Gordon A y Anicotte JS 2003). El efecto de los fibratos que conduce al catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL), se debe a la estimulación de la lipoproteinlipasa dependiente de los PPAR $\alpha$  con inhibición simultánea de la apolipoproteína C-III causada por la represión del factor nuclear hepático 4 (Schiffrin E y Amiri P, 2003; Gordon A y Anicotte JS, 2003). El estado de ayuno prolongado y la activación de los PPAR $\alpha$  incrementa la transcripción de la hidroximetilglutaril-coenzima A sintetasa mitocondrial y citosólica, enzima clave en el control de la cetogénesis. Otros mecanismos implicados en la modulación del fenotipo de lipoproteínas como consecuencia de la utilización de fibratos incluyen: reducción en la producción de triglicéridos en los hepatocitos, aumento de la captación y catabolismo de partículas LDL, reducción en la actividad de la acetal-CoA carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos que aumentan la  $\beta$ -oxidación (Schiffrin E y Amiri P, 2003; Gordon A y Anicotte JS 2003; Kota PB y Hsun-Wei T, 2005).

### ***1.7.7.- PPAR $\alpha$ e hipertensión***

Un gran número de estudios se han llevado a cabo para definir el mecanismo celular y molecular que los PPAR $\alpha$  desempeñan en la vasculatura y en el sistema cardiovascular. Primeramente se identificó que el activador de los PPAR $\alpha$ : el fenofibrato, significativamente reducía el interferón  $\gamma$  en plasma y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en pacientes con hiperlipoproteinemia Iib (Madej A 1998), demostrando la actividad antiinflamatoria de este receptor peroxisomal. También, se ha demostrado que otros activadores de los PPAR $\alpha$  disminuyen la expresión de genes inducidos por citocinas, como la expresión de moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1) en células endoteliales (Marx N 1999). Por otro lado, se ha reportado que ratones deficientes en PPAR $\alpha$  tienen una exagerada respuesta inflamatoria a la estimulación por lipopolisacárido (Delerive P 1997). El mecanismo molecular de la acción antiinflamatoria de los activadores de los PPAR $\alpha$  se cree que se relaciona con su antagonismo con la ruta de señalamiento del NF- $\kappa$ B (Delerive P 1997).

Los efectos benéficos de los fibratos, prototipo de ligando de PPAR $\alpha$ , en el mejoramiento de la función cardiovascular, incluyen el sistema NO/NOS (Tabernerero A y Schoonjans A, 2002) en donde se ha observado que los activadores de los PPAR $\alpha$  mejoran la vasodilatación mediada por NO (Diep QN 2002); en otro estudio, el clofibrato, WY643 y fenofibrato aumentaron la producción de NO en riñón (Newas MA y Ranganna K, 2004). La activación de los PPAR $\alpha$  por fenofibrato (10 $\mu$ M/L) aumentó la actividad y expresión de eNOS en células endoteliales principalmente por un mecanismo en el que el PPAR $\alpha$  estabiliza el RNAm de la eNOS, esta observación explica uno de los mecanismos por los que el PPAR $\alpha$  lleva a cabo la protección cardiovascular (Goya K *et al*, 2004).

El ácido docosahexanoico (DHA) activador de los PPAR $\alpha$  administrado en ratas infundidas con angiotensina II demostró reducir el estrés oxidativo y los mediadores de la respuesta inflamatoria en vasos sanguíneos (Diep QN 2002). La hipertensión arterial sistólica observada en ratas infundidas con angiotensina II disminuyó en respuesta a la administración con DHA de 172 $\pm$ 3 a 112 $\pm$ 4mm Hg (p<0.01). En este mismo estudio se demostró que la actividad de la NADPH oxidasa, medida por quimioluminiscencia, y la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM), y VCAM-1 se aumentaban significativamente en vasos sanguíneos de ratas infundidas con angiotensina II, estos cambios se eliminaron con la administración de DHA. Por lo tanto, la activación de los PPAR $\alpha$  disminuye el desarrollo de la hipertensión arterial, corrige anormalidades estructurales y mejora la disfunción endotelial inducida por angiotensina II. Estos efectos se asociaron con la disminución del estrés oxidativo y de la inflamación en la pared vascular (Diep QN 2002).

Los PPAR $\alpha$  puede además modular *in vitro* la producción vascular de péptidos vasoactivos como la endotelina 1 (ET-1). En una investigación reciente (Iglarz M y Touyz RM, 2003), se determinó la interacción entre los PPARs y ET-1 en ratas con hipertensión arterial dependiente de la administración de DOCA-sal, el activador de los PPAR $\alpha$  fenofibrato disminuyó el RNAm de la prepro-endotelina evitándose así la disfunción endotelial en estas ratas además de que el fenofibrato evitó el aumento en la producción de anión superóxido.

Uno de los factores clave en la regulación de la función cardiovascular está dado por el balance entre NO y radicales libres. Se ha reportado que el aumento de O $_2^-$  causa una

disminución en la biodisponibilidad de NO por la reacción que inactiva al NO, aumentándose la producción de especies reactivas de oxígeno especialmente  $O_2^-$  que contribuye significativamente a las alteraciones estructurales y funcionales de la hipertensión (Beswick RA y Dorrance AM 2001; Cowley AW y Mori T, 2003); ya que el balance entre el sistema NO/NOS y ROS es crucial para la óptima función del sistema cardiovascular, los activadores de los PPAR $\alpha$  además de mejorar la disponibilidad del NO, mejoran la actividad de los sistemas antioxidantes. Esto está demostrado en estudios recientes en los que los activadores de los PPAR $\alpha$  disminuyen el estrés oxidativo (Newaz M y Blanton A, 2005), reduciendo el RNAm de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa en células endoteliales, además de que estos activadores aumentan el RNAm de la enzima antioxidante SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> en hígado y células endoteliales (Newaz M y Blanton A, 2005). Estos datos sugieren que la activación de los PPAR $\alpha$  contribuye a la regulación normal de la presión sanguínea y ejerce acciones de protección durante la hipertensión arterial vía el mecanismo dual que involucra la producción de NO y aumento de la actividad y expresión de SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> y la inhibición de la generación de radicales libres.

## ***II.- HIPÓTESIS***

La estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato producirá un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes así como también un aumento en su expresión, lo cual modulará en forma más efectiva la presencia de especies reactivas de oxígeno; disminuyéndose de este modo la peroxidación de lípidos. La estimulación por clofibrato producirá además un aumento en la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) lográndose un mejor control de la presión arterial y disminuyendo por ende el daño a órganos blanco.

## ***III.- OBJETIVO***

### **3.1.- Objetivo general**

Caracterizar los efectos de la administración del clofibrato, como agente activador de los PPAR $\alpha$ , sobre la expresión y actividad de enzimas relacionadas con el balance redox en un modelo de hipertensión arterial inducido por coartación aórtica.

### **3.2.- Objetivos particulares**

- ***Objetivo particular I:*** Estudiar si, en la hipertensión arterial inducida por coartación aórtica, la estimulación de PPAR $\alpha$ , aumenta la actividad y expresión de las enzimas involucradas en la regulación del estado óxido reducción: catalasa y SOD con lo que se disminuiría el estrés oxidativo y por tanto el daño producido a lípidos de órganos blanco (ventrículo izquierdo y riñón hipertrófico).
- ***Objetivo particular II:*** Determinar el efecto de la administración del clofibrato tiene sobre la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) así como sobre los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> y su repercusión en la modulación de la presión arterial.
- ***Objetivo particular III:*** Determinar la relación entre la disminución de las especies reactivas de oxígeno y la regulación efectiva de la presión arterial sistólica en el tiempo en ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato.

## IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1.- MATERIAL

<b>COMPUESTO</b>	<b>MARCA</b>
Acido fosfórico	Sigma
Archilamida	BioRad
Albúmina sérica bovina	Sigma
Azida de sodio	Sigma
Azul brillante de coomassie	Sigma
Azul de bromofenol	Sigma
Beta- mercaptoetanol	Bio Rad
Bis-acrilamida	BioRad
Citocromo c	Sigma
Clofibrato	Sigma
Complete (inhibidor de proteasas)	Roche Diagnostics
EDTA	Sigma
Etanol absoluto	Sigma
Eter etílico	Merck
Glicerol	Sigma
Glicina	BioRad
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma
HCl	Sigma
Heparina	PiSA
Iodopovidona	Diafra
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
KCl	Técnica Química
KCN	Laboratorios Latis
Leche descremada	Svelty Nestlé
Metanol absoluto	Calbiochem
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	J.T.Baker
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	J.T Baker
NaCl	J.T. Baker
NaF	J.T.Baker
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
Pentobarbital sódico	Pfizer
Persulfato de amonio	Sigma
Prestained SDS-PAGE Standard, high range	BioRad
SDS	BioRad
Solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9%	DelMed
TEMED	BioRad
Tris base	BioRad
Tris-HCl	Sigma
Tritón X-100	Sigma
Tween20	Sigma
Xantina	Sigma
Xantina oxidasa	Sigma

## **4.2.- MÉTODOS**

### **4.2.1.- COARTACIÓN AÓRTICA**

#### **4.2.1.1.- FISIOPATOLOGÍA**

Experimentalmente, la coartación de la aorta es un modelo empleado para producir hipertensión arterial. Los mecanismos por los cuales se desarrolla la hipertensión son: la coartación por sí misma y el aumento de la resistencia vascular periférica, incremento de la impedancia del flujo aórtico, así como las respuestas neurohumorales. La coartación por encima de uno o ambos riñones aumenta la actividad del sistema renina-angiotensina lo cual contribuye al efecto presor. Además, se ha asociado a la coartación aórtica, con un incremento en la liberación de catecolaminas a la circulación sistémica.

Se usaron ratas Wistar macho de 250 a 280g, (las ratas provinieron del Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”), las cuales se dividieron en 3 grupos. *Grupo 1*: ratas falsamente coartadas o “sham” las cuales fueron administradas con vehículo (aceite comestible) vía intraperitoneal (i.p); *Grupo 2*: ratas coartadas administradas con vehículo vía i.p y *Grupo 3*: ratas coartadas las cuales fueron administradas con clofibrato (100mg/Kg/día) vía i.p; los tres grupos se anestesiaron con éter etílico y bajo condiciones asépticas, se les practicó una insición en la región abdominal media de aproximadamente 3cm y se llevó a cabo laparotomía en la que se expusieron las arterias renal derecha, mesentérica superior y aorta. A dos grupos (animales con coartación) se les ligó parcialmente la aorta, entre la arteria renal derecha e izquierda, con hilo seda del No. 000, de tal forma que se redujo aproximadamente 75% el flujo sanguíneo aórtico, la reproducibilidad del método se logró colocando una aguja del No. G19 sobre la arteria y anudando sobre ella, posteriormente se retiró la aguja. Al grupo control (sham) no se le colocó la ligadura. Se suturó a los animales por planos y se mantuvieron con agua y comida *ad libitum* por un período de 1 y 21 días.

#### **4.2.2.- REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL**

Transcurrido el período de 1 y 21 días de coartación aórtica, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p) y se colocó una cánula PE90 en la arteria carótida, conteniendo solución heparinizada (10 U.I /ml) la cual estaba conectada a un



transductor de presión. La canulación de la arteria carótida se consiguió realizando un corte en la parte frontal del cuello de la rata y separando los tejidos hasta exponerla, se disecó, se limpió de tejido conectivo y se refirió con dos hilos de seda (No. 000). El flujo sanguíneo se interrumpió por oclusión de la arteria proximal al corazón con una pinza hemostática, y el lado distal se ligó definitivamente con el hilo de seda. Se realizó un pequeño corte transversal en la arteria, tan cerca al extremo ligado como fue posible y en un ángulo que permitió levantar, con una pinza, la pared del vaso mientras se insertó la cánula; en este momento se retiró la pinza hemostática y se introdujo más la cánula y esta se ligó alrededor del vaso con el segundo hilo. La cánula se alineó al vaso atándola al hilo colocado en la parte distal.

#### ***4.2.3.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA (PARA DETERMINAR EXPRESIÓN PROTEÍCA Y DETERMINACIÓN PROTEÍCA POR EL MÉTODO BRADFORD)***

Después de haberles medido la presión a las ratas en la arteria carótida y estando la rata aún anestesiada con pentobarbital (50 mg/Kg/i.p) se les extrajo el riñón hipertrófico (riñón derecho) y el ventrículo izquierdo. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. El tejido se homogenizó a 4°C con ayuda de un Polytron (modelo PT- MR 2100) en buffer de homogenización conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas se determinó por el método Bradford.

#### ***4.2.4.- DETERMINACIÓN PROTEÍCA POR EL MÉTODO BRADFORD***

El ensayo se basa en la reacción de las proteínas con una solución alcalina de azul brillante de Coomassie. El desarrollo del color se basa en la reacción de la proteína y el cobre, en medio alcalino, y la subsecuente reducción del azul brillante de coomassie por la proteína. El desarrollo del color es principalmente debido a los aminoácidos tirosina y triptofano y, en menor grado, a cistina, cisteína e histidina. Las proteínas reducen el azul brillante de coomassie por pérdida de 1, 2 o 3 átomos de oxígeno y producen una o más especies reducidas, que presentan un color azul característico con absorbancia máxima a 750 nm y mínima a 405 nm.

Se preparó un estándar de albúmina sérica bovina (1mg/ml) del cual se tomaron diferentes alícuotas (0, 20, 60, 80, y 100 µl) para construir una curva patrón; el volumen se llevó a 100 µl con agua y se agregaron 900 µl del reactivo de Bradford. Se

agitaron las muestras, se dejaron reposar 10 minutos y se determinó la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo R4235 a 595 nm.

La determinación de la concentración de proteína en las muestras biológicas se llevó a cabo de la misma forma: en el tubo de ensayo se colocaron 10 µl del homogenado renal ó ventricular más 90 µl de agua y 900 µl de reactivo de Bradford, se agitaron en vortex y se dejaron reposar durante 10 minutos. Se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo R4235 a 595 nm.

La concentración de proteínas en las muestras fue obtenida por interpolación con los valores de absorbancia de la curva patrón.

#### **4.2.5.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SOD**

La superóxido dismutasa es la única enzima para la que su sustrato es un radical libre inestable, esto complica la medición de su actividad catalítica. Por lo que este ensayo consiste de dos componentes: un generador de superóxido, y un detector de superóxido. El generador sirve para producir el radical a una velocidad controlada. En ausencia de SOD, el radical reacciona con el detector. Si SOD está presente, compete con el detector por el superóxido. En este ensayo la xantina/xantina oxidasa se emplea como fuente de superóxido y el citocromo c se emplea como un detector del radical.

Si se desea determinar la contribución de SODCu<sup>2+/-</sup>Zn<sup>2+</sup> y SODMn en la actividad total se debe considerar que la SODCu<sup>2+/-</sup>Zn<sup>2+</sup> es susceptible a inhibición por cianuro de potasio y la SODMn no se ve afectada por concentraciones del mismo. Por lo que, en presencia de cianuro de potasio (1mM) la actividad de la SODCu<sup>2+/-</sup>Zn<sup>2+</sup> se disminuye en un 90%; y su actividad puede ser calculada por la diferencia entre la actividad total y la actividad debida a SODMn (McCord JM y Fridovich I, 1969; Crapo J y McCord J, 1969).

*Preparación de la muestra:* Se pesó 0.5 g de riñón hipertrófico ó ventrículo izquierdo y se homogenizó en 5 volúmenes de buffer de carbonatos (20 mM, pH 10.2) en Polytron (modelo PT- MR 2100).

#### **Determinación de SOD total**

*Preparación del blanco:* En una celda de cuarzo de 3 ml se agregaron 10 µl de agua y 2.85 ml de la solución sustrato (la preparación de esta solución se indica en el anexo de preparación de soluciones), la reacción se inició agregando 50 µl de la solución de xantina oxidasa, se tapó la celda y se agitó. Se leyó cada 30 segundos durante 3

minutos y se midió la velocidad de aumento de la absorbancia a 550 nm. Este aumento de velocidad debía ser cercana a 0.020 por minuto.

*Preparación de muestra:* En una celda de cuarzo de 3 ml se agregaron 10  $\mu$ l de la muestra homogenada en estudio, 2.85 ml de solución sustrato y 50  $\mu$ l de la solución de xantina oxidasa, se tapó la celda y se agitó. Se leyó a 550 nm cada 30 segundos por 3 minutos.

#### **Determinación de SODMn**

Para determinar la actividad de SODMn utilizó una solución de KCN (1mM) para inhibir a la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ .

*Preparación del blanco:* En una celda de cuarzo de 3 ml se agregaron 10  $\mu$ l de agua, 2.85 ml de la solución sustrato y KCN (1mM), la reacción se inició agregando 50  $\mu$ l de la solución de xantina oxidasa, se tapó la celda y se agitó. Se leyó cada 30 segundos durante 3 minutos. Se midió la velocidad de aumento de la absorbancia a 550 nm. Este aumento de velocidad debió ser cercana a 0.020 por minuto.

*Preparación de muestra:* En una celda de cuarzo de 3 ml se agregaron 10  $\mu$ l de la muestra homogenada en estudio, 2.85 ml de solución sustrato, 50  $\mu$ l de KCN (1mM) y 50  $\mu$ l de la solución de xantina oxidasa, se tapó la celda y se agitó. Se leyó a 550 nm cada 30 segundos por 3 minutos.

La actividad de la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  se determinó por la diferencia entre la actividad de la SOD total y la actividad de la SODMn.

Es importante señalar que una unidad de SOD (U) se define como la cantidad de SOD requerida para producir 50% de inhibición bajo condiciones específicas. El resultado de la actividad de SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  está dado por unidades de SOD/ mg de proteína.

#### **4.2.6.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CATALASA**

La catalasa ejerce una doble función: Por un lado lleva a cabo la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para dar agua y oxígeno y por otro, lleva a cabo la oxidación de donadores  $\text{H}^+$  con el consumo de 1 mol de peróxido.

La descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la catalasa, presente en las muestras, sigue una cinética de primer orden de acuerdo a la ecuación:

$$K = 2.3 t \log A_0/A$$

Donde K es la constante de velocidad de la reacción de primer orden, t es el tiempo sobre el cual disminuye  $\text{H}_2\text{O}_2$  debida a la actividad de catalasa y  $A_0/A$  es la densidad

óptica en los tiempos 0 y 15 segundos, respectivamente. El resultado de la actividad de catalasa está dado por K de catalasa/mg de proteína.

La cuantificación de la actividad de catalasa en el tejido se logró por el método basado en la desaparición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM) en buffer de fosfato (10 mM; pH 7.4) leído a 240 nm a 25°C.

Para determinar la actividad de la catalasa se mezclaron 25 µl del homogenado (riñón hipertrófico ó ventrículo izquierdo el cual se prepara como se mencionó anteriormente) con 725 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM). La densidad óptica se midió a 240 nm a los 0, 15 y 30 segundos. El aumento en la densidad óptica debe ser entre 0.02 y 0.2 cada 15 segundos. La cantidad de proteína que se empleó en el ensayo estaba en el rango de 0.006-0.02 mg para riñón hipertrófico y 0.16-0.31 mg para ventrículo izquierdo (Aebi H 1984; Bonnichsen R.K 1947; Cohen G y Dembiec ST, 1970; Aebi H 1983). La dilución del homogenado para riñón hipertrófico y ventrículo izquierdo fue 1:30 (v/v).

#### **4.2.7.- CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

La cuantificación se realizó en homogenado de riñón hipertrófico ó ventrículo izquierdo. El tejido (250 mg) se homogenizó en 20 vol de solución salina (0.9%). Se incubaron alícuotas de 10 µl en presencia de diacetato 2,7 diclorofluoresceína (DCF-DA, 5 µM a 37°C/60 minutos. La concentración de especies reactivas de oxígeno se evaluó midiendo la fluorescencia emitida por la mezcla de reacción a una longitud de onda de excitación de 188 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm en un espectro de luminiscencia (Perkin Elmer L550-B). La concentración de ROS en las muestras se obtuvo por interpolación con una curva de concentración del estándar de 2,7- diclorofluoresceína (10 mM).

#### **4.2.8.- CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS PEROXIDADOS**

Uno de los principales tipos de daño celular causado por radicales libres es la peroxidación de lípidos, la cual es el daño oxidativo en los lípidos poliinsaturados de las membranas, susceptibles a oxidación por el oxígeno molecular a través de un proceso en cadena llevado a cabo por radicales libres. El resultado final de la peroxidación de lípidos es una alteración en la composición del lípido que constituye la membrana celular, por tal motivo cambian, sus propiedades fisicoquímicas, por ejemplo: aumenta

su rigidez, lo que origina que la célula muera debido a las modificaciones energéticas y estructurales.

Tanto el riñón hipertrófico como el ventrículo izquierdo se homogenizaron cada uno en 3ml de agua destilada, se tomó una alícuota de 1 ml a la cual se le agregó 4 ml de la mezcla cloroformo-metanol 2:1 v/v. Las muestras se agitaron, se protegieron de la luz y se colocaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente, la fase superior se retiró cuidadosamente por aspiración (es muy importante retirar completamente esta fase, ya que de lo contrario interfiere con la determinación fluorescente). La fluorescencia de la fase clorofórmica se determinó a 350 nm de excitación y 430 nm de emisión en un espectro de fluorescencia Perkin-Elmer modelo L550-B. Para calibrar el ensayo, se ajustó el espectrofluorómetro a 140 unidades de fluorescencia con solución de calibración (solución de quinina de 0.001mg/ml). Se empleó el método Bradford para determinar el contenido de proteína en la muestra. El resultado se expresó como unidades relativas de fluorescencia por miligramo de proteína (URF/mg prot).

#### **4.2.9.- EXPRESIÓN PROTEÍCA DE NOS-3, SOD $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ , $AT_1$ Y $AT_2$**

La separación de proteínas de la muestra se llevó a cabo mediante electroforesis para la cual se empleó el equipo de electroforesis Miniprotein II de BioRad. Se llevó a cabo la preparación de los geles concentrador y de corrida con la composición que se muestra a continuación:

	<b>Gel de corrida poliacrilamida 10% (eNOS)</b>	<b>Gel de corrida, poliacrilamida 12.5% (SOD <math>Cu^{2+}/Zn^{2+}</math>, <math>AT_1</math> y <math>AT_2</math>)</b>
<i>Agua desionizada</i>	6.25 ml	5.25 ml
<i>Tris-Cl/SDS pH 8.8</i>	3.75 ml	3.75 ml
<i>Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%</i>	5.00 ml	6.00 ml
<i>Persulfato de amonio 10%</i>	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
<i>TEMED</i>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
	<b>Gel concentrador 6%</b>	
<i>Agua desionizada</i>	3.05 ml	
<i>Tris-Cl/SDS pH 6.8</i>	1.25 ml	
<i>Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%</i>	0.65 ml	
<i>Persulfato de amonio 10%</i>	0.025 ml	
<i>TEMED</i>	0.005 ml	

En ambos casos las cantidades anotadas para llevar a cabo la electroforesis eran suficientes para preparar 2 geles, de 8x11 cm. Se preparó el gel de corrida, se llenó con este, la cámara de electroforesis hasta 1.5 cm antes del borde superior de las placas. Se completó el volumen de la cámara con SDS al 1%, y se niveló la cámara con un nivel de burbuja, de tal manera que se formó una interfase lo más homogénea y lineal posible. Se dejó solidificar el gel de 30 a 40 minutos. Unos 5 minutos antes de que estuviera listo el gel, se inició la preparación del gel concentrador. Cuando el gel de corrida hubo solidificado se retiró el SDS (1%) y se enjuagó con agua desionizada, secando con papel filtro y cuidando de no tocar demasiado el gel con el papel. Se colocó rápidamente el gel concentrador y se llenó hasta el borde de las placas de vidrio. Se insertó cuidadosamente el peine para formar los pozos. Se esperó de 10 a 15 minutos, y se retiró el peine al término de este tiempo. Los geles estaban listos para correrse.

Se colocaron volúmenes apropiados de homogenado total de riñón hipertrófico y ventrículo izquierdo en 50 µl de solución buffer de carga con concentración de proteína de 80-100 µg. Las proteínas se desnaturalizaron en un baño a 95°C por 1 minuto y se colocaron inmediatamente en hielo. Una vez cargadas las muestras en el gel, se corrió la electroforesis usando buffer de corrida de Tris-Glicina-SDS pH 8.3, el voltaje aplicado fue de 100 mV durante 2 horas. Se usaron marcadores de peso molecular conocido que se corrieron conjuntamente para determinar los pesos aproximados de las proteínas separadas (prestained SDS-PAGE Standard, high range, BioRad). Una vez corrida la electroforesis, el gel se utilizó para llevar a cabo la transferencia a una membrana de PVDF. Para este paso se empleó el sistema Trans-Blot SD Semydry Transfer Cell de BioRad.

Primero fue necesario hacer un “emparedado” en la unidad de transferencia. Se prehumedeció, la membrana de PVDF en metanol absoluto por 1 minuto aproximadamente y después en buffer de transferencia por otros 5 minutos. El gel también se mantuvo húmedo en buffer de transferencia. La transferencia se llevó a cabo aplicando corriente (110 mA) por una hora. Al finalizar la transferencia, la membrana se retiró con cuidado y se dejó en solución bloqueadora de PBS-leche al 5% por 1 hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo contra:

	DILUCION
eNOS (anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz)	1:100 en PBS-leche al 1%
SOD-1 (anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz)	1:100 en PBS-leche al 1%
AT <sub>1</sub> (anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz)	1:100 en PBS-leche al 1%
AT <sub>2</sub> (anticuerpo policlonal de conejo Santa Cruz)	1:100 en PBS-leche al 1%

La incubación de la membrana con el anticuerpo primario se llevó a cabo por 12 horas a 4°C. Al término de la incubación, se hicieron 3 lavados con PBS-Tween (0.05%) por 15 minutos cada uno. Después, se incubó con el anticuerpo secundario (chivo-anticonejo-peroxidasa, Amersham) diluído 1:3000 en PBS-leche al 1% por 1 hora. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween (0.05%) por 15 minutos cada uno. El revelado se llevó a cabo usando quimioluminiscencia de acuerdo al protocolo del fabricante (Immobilon Western chemiluminescent HPR substrate Millipore). La membrana se puso en contacto con película Kodak MXB durante 1 minuto. Se reveló la película y se llevó a cabo la cuantificación de la proteína existente por densitometría, utilizando el sistema KODAK EDAS 120 system.

## ***V.- Resultados***

Veinticuatro horas posteriores a la coartación de la aorta, el registro de la presión arterial, en la carótida de ratas falsamente ligadas (sham) y coartadas tratadas con vehículo, mostró que la ligadura de la aorta produjo un aumento significativo de la presión arterial sistólica de las ratas ligadas ( $156.8 \pm 9.42$  mmHg), en comparación con las ratas sham ( $111.2 \pm 2.33$  mmHg)  $p < 0.001$  (Figura 1). Las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100mg/kg) tuvieron valores de presión arterial sistólica menores ( $125 \pm 4.74$  mmHg) comparadas con las ratas coartadas tratadas con vehículo ( $156.8 \pm 9.42$  mmHg)  $p < 0.01$  durante 1 día de tratamiento. En los grupos de ratas que fueron tratadas por 21 días observamos que en las coartadas tratadas con vehículo se produjo aumento de la presión arterial sistólica ( $175.55 \pm 8.9$  mmHg) comparado con las ratas falsamente coartadas (sham) ( $106 \pm 4.3$  mmHg)  $p < 0.001$ , las ratas coartadas tratadas con clofibrato presentan valores de presión arterial de  $123.6 \pm 11.3$ , lo cual fue significativamente menor comparada con las ratas coartadas tratadas únicamente con vehículo ( $175.55 \pm 8.9$  mmHg)  $p < 0.01$ . Por lo que a través de los experimentos realizados podemos comprobar que la estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/Kg) tanto en 1 como en 21 días evita el aumento de la presión arterial sistólica en las ratas coartadas tratadas con el fármaco comparado con los niveles de presión encontrados en ratas coartadas tratadas con vehículo (Figura 1).

En la figura 2A se muestra que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en riñón hipertrófico después de 1 día post coartación de la aorta estas son más altas en las ratas coartadas tratadas con vehículo ( $2.580 \pm 1.095$  nmol DCF/mgprot/min) que en el grupo de ratas falsamente coartadas (Sham) ( $0.7748 \pm 0.205$  nmol DCF/mgprot/min). La estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/Kg) en el riñón hipertrófico después de 1 día pos coartación de la aorta inhibe el aumento de ROS ( $1.011 \pm 0.537$  nmolDCF/mgprot/min) comparado con la producción de estas especies en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $2.580 \pm 1.095$  nmolDCF/mgprot/min). La estimulación de clofibrato permite que la disminución de ROS en ratas tratadas llegue a ser casi la misma que la de las ratas falsamente coartadas (sham). Sin embargo después de 21 días de tratamiento pos coartación de la aorta no se observa ningún cambio en la producción de ROS en ninguno de los 3 grupos en estudio (Figura 2B).



La producción de lípidos peroxidados en el riñón hipertrófico de las ratas que fueron tratadas por 1 día después de la coartación de la aorta muestran una tendencia a ser más altas en las ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.9037 \pm 0.12$  URF/mg proteína) que en el grupo de ratas falsamente coartadas (Sham) ( $0.7557 \pm 0.19$  URF/mg proteína). La estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/Kg) en el riñón hipertrófico después de 1 día de coartación de la aorta muestra una tendencia a disminuir la producción de lípidos peroxidados ( $0.7209 \pm 0.09$  URF/mg proteína) comparado con la producción de estas especies en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.9037 \pm 0.12$  URF/mg proteína) (Figura 3A). Después de 21 días de coartación de la aorta se observa que las ratas coartadas tratadas con clofibrato tienden igualmente a disminuir la producción de lípidos peroxidados ( $0.6655 \pm 0.03$  URF/mg proteína) comparado con la producción de estos en ratas coartadas tratadas únicamente con vehículo ( $0.9556 \pm 0.18$  URF/mg proteína) (Figura 3B).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ventrículo izquierdo de ratas con 1 día de coartación de la aorta muestra que estas son más altas en las ratas coartadas tratadas con vehículo ( $2.107 \pm 0.290$  nmolDCF/mgprot/min) que en el grupo de ratas falsamente coartadas (Sham) ( $1.141 \pm 0.306$  nmolDCF/mgprot/min). La estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/Kg) en ventrículo izquierdo después de 1 día de coartación de la aorta inhibe el aumento de ROS ( $1.737 \pm 0.503$  nmolDCF/mgprot/min) comparado con la producción de estas especies en ratas coartadas tratadas con vehículo. La estimulación con clofibrato permite que la producción de especies reactivas de oxígeno en ratas tratadas llegue a ser casi la misma que la de las ratas falsamente coartadas (sham). Después de 21 días de tratamiento, (Figura 4B) la producción de especies reactivas de oxígeno en ventrículo izquierdo en ratas con coartación de la aorta fue mayor en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $1.950 \pm 0.247$  nmol DCF/mgprot/min) comparada tanto con las ratas falsamente coartadas (sham) ( $1.616 \pm 0.312$  nmol DCF/mgprot/min) y las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) produjeron ( $1.271 \pm 0.129$  nmol DCF/mgprot/min)  $p < 0.05$ .

En la figura 5A se muestra que la producción de lípidos peroxidados en ventrículo izquierdo en ratas después de 1 día de coartación de la aorta es más alta en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.6903 \pm 0.0902$  URF/mg proteína) que en el grupo de ratas falsamente coartadas (Sham) ( $0.3471 \pm 0.085$  URF/mg proteína). La estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/Kg) en el ventrículo izquierdo después de 1 día de coartación de la aorta disminuyó un poco la producción de lípidos peroxidados ( $0.4783 \pm 0.1728$  URF/mg proteína) comparado con la producción de estas especies en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.6903 \pm 0.0902$  URF/mg proteína) (Figura 5A). Después de 21 días pos coartación de la aorta se observa que las ratas coartadas tratadas con clofibrato tienden a disminuir la producción de lípidos peroxidados ( $0.6431 \pm 0.099$  URF/mg proteína) comparada con la producción de lípidos peroxidados en ratas coartadas tratadas únicamente con vehículo ( $0.8888 \pm 0.171$  URF/mg proteína) (Figura 5B).

Los resultados del análisis cuantitativo de la expresión de la SODCu<sup>2+/Zn<sup>2+</sup></sup> tanto en riñón hipertrófico como en ventrículo izquierdo se muestran en la figuras 6A y 6B.

En riñón hipertrófico después de 1 día de la coartación de la aorta, la expresión de SOD Cu<sup>2+/Zn<sup>2+</sup></sup> fue mayor en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) comparadas con las ratas coartadas tratadas con vehículo durante 1 día de tratamiento ( $p < 0.05$ ). Después de 21 días de tratamiento tanto las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) y las ratas coartadas tratadas con vehículo tienen la misma expresión de la enzima (Figura 6A).

En ventrículo izquierdo después de 1 día de tratamiento las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) tienen una mayor expresión de a SODCu<sup>2+/Zn<sup>2+</sup></sup> que las ratas coartadas tratadas con vehículo; el mismo efecto se observa en las ratas coartadas después de 21 días de tratamiento con clofibrato (100 mg/Kg) ( $p < 0.05$ ) (Figura 6B).

El aumento de la expresión de la enzima observado en ventrículo izquierdo difiere al que observamos en riñón hipertrófico en donde la expresión de la enzima disminuye después de 21 días de tratamiento con clofibrato (100 mg/kg)  $p < 0.01$ .

Los resultados del análisis cuantitativo de la actividad de la SOD $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  después de 1 día de la coartación de la aorta en riñón hipertrófico muestran que la actividad de la SOD $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en riñón hipertrófico fue equiparable en el grupo sham y coartada tratada con vehículo:  $1.721 \pm 0.170$  y  $1.815 \pm 0.270$  USOD/mg de proteína respectivamente, mientras que en las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) la actividad de la enzima fue mayor ( $2.315 \pm 0.311$  USOD/mg de proteína). La actividad de la SOD total en los riñones de ratas del mismo grupo fue de  $2.549 \pm 0.212$ ,  $2.56 \pm 0.202$  y  $3.217 \pm 0.394$  para las ratas sham, coartada tratada con vehículo y coartadas tratada con clofibrato (100 mg/Kg) respectivamente. Como se puede observar la actividad de la enzima de las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) fue mayor que la de los otros grupos  $p < 0.001$  (Figura 7A).

Veintinueve días posteriores a la coartación de la aorta los valores de la actividad de la SOD $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  fueron muy similares entre grupos:  $0.9453 \pm 0.056$ ,  $0.9188 \pm 0.030$  y  $0.8085 \pm 0.045$  para las ratas sham, coartada tratada con vehículo y coartadas tratada con clofibrato (100 mg/Kg) respectivamente. Los valores de la actividad de la SOD total en los tres grupos fue similar después de 21 días posteriores a la coartación de la aorta (figura 7B).

La figura 8A muestra la cuantificación de la actividad de la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  después de 1 día de la coartación de la aorta en ventrículo izquierdo. La actividad de esta enzima fue similar en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $27.08 \pm 5.73$  USOD/mg de proteína) comparada con las ratas falsamente coartadas (sham) ( $31.96 \pm 12.33$  USOD/mg). Sin embargo la actividad de la enzima en las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) fue mayor ( $69.40 \pm 8.203$  USOD/mg de proteína) comparada con los dos grupos anteriores. La actividad total de la enzima en ventrículos en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100mg/Kg) fue mayor ( $108.2 \pm 5.63$  USOD/mg de proteína) comparada con la actividad total de la enzima en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $52.30 \pm 3.63$  USOD/mg de proteína,  $p < 0.01$ ).

La figura 8B muestra la actividad de la SOD $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en ventrículo izquierdo después de 21 días después de la coartación de la aorta. Tanto en ratas falsamente coartadas ( $13.37 \pm 2.55$  USOD/mg), ratas coartadas tratadas con vehículo ( $10.42 \pm 2.21$  USOD/mg de proteína) y ratas coartadas tratadas con clofibrato (100mg/Kg) ( $9.905 \pm 1.82$  USOD/mg de proteína) no se observa cambio en la actividad de la SOD  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ .

La cuantificación de la actividad de la catalasa después de 1 día de la coartación de la aorta en riñón hipertrófico muestra que la actividad de la catalasa fue similar en las ratas falsamente coartadas (Sham) ( $0.020 \pm 0.0013$  K/mg proteína) y en las ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.019 \pm 0.009$  K/mg proteína) sin embargo el tratamiento con clofibrato (100 mg/kg) por 1 día en ratas con coartación de la aorta induce un aumento en la actividad de la catalasa ( $0.034 \pm 0.006$  K/mg proteína,  $p < 0.05$ ) (figura 9A). Después de 21 días de la coartación de la aorta la actividad de la enzima en riñón es muy parecida tanto ratas falsamente coartadas (sham) ( $0.0085 \pm 0.0003$  K/mg proteína), ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.0084 \pm 0.0004$  K/mg proteína) y ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) ( $0.0095 \pm 0.0007$  K/mg proteína) (Figura 9 B).

La figura 10A muestra los resultados del análisis cuantitativo de la actividad de la catalasa después de 1 día pos coartación de la aorta en ventrículo izquierdo. La actividad de la catalasa fue similar en ratas falsamente coartadas (sham) ( $0.0164 \pm 0.003$  K/mg proteína) y en ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.01199 \pm 0.0005$  K/mg proteína). La actividad de la enzima en las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) fue mayor ( $0.0205 \pm 0.003$  K/mg proteína)  $p = 0.002$  comparada con los dos grupos anteriores.

La actividad de la enzima en el ventrículo izquierdo después de 21 días de la coartación de la aorta es muy parecida tanto en ratas falsamente coartadas (sham) ( $0.0305 \pm 0.0033$  K/mg proteína), ratas coartadas tratadas con vehículo ( $0.0297 \pm 0.0025$  K/mg proteína) y en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) ( $0.0268 \pm 0.0040$  K/mg proteína) (Figura 10B).

El nivel de la expresión de la eNOS en riñón hipertrófico después de 1 día de la coartación de la aorta fue semejante en ratas coartadas tratadas con vehículo y en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100mg/Kg); Después de 21 días de la coartación de la aorta la expresión de la eNOS en riñón hipertrófico es mayor en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg)  $p < 0.001$  que la observada las ratas coartadas tratadas con vehículo. Podemos observar que la expresión de esta enzima es mayor en ratas coartadas con clofibrato (100 mg/kg) después de 21 días de la coartación que en las ratas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) después de 1 día de la coartación de la aorta  $p < 0.05$ . Es importante señalar que la expresión de la eNOS en las ratas tratadas con vehículo después de 1 día de la coartación disminuye a los 21 días de la coartación de la aorta en las ratas coartadas tratadas con vehículo  $p < 0.05$  (Figura 11A).

En ventrículo izquierdo después de 1 día de la coartación aórtica la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial fue mayor en ratas coartadas tratadas con vehículo que en ratas falsamente coartadas (sham). La estimulación de los PPAR $\alpha$  en las ratas coartadas tratadas con el fármaco aumenta la expresión de la sintasa del óxido nítrico comparada con la expresión tanto de las ratas coartadas tratadas con vehículo  $p<0.05$  y las ratas falsamente coartadas (Sham)  $p<0.01$ .

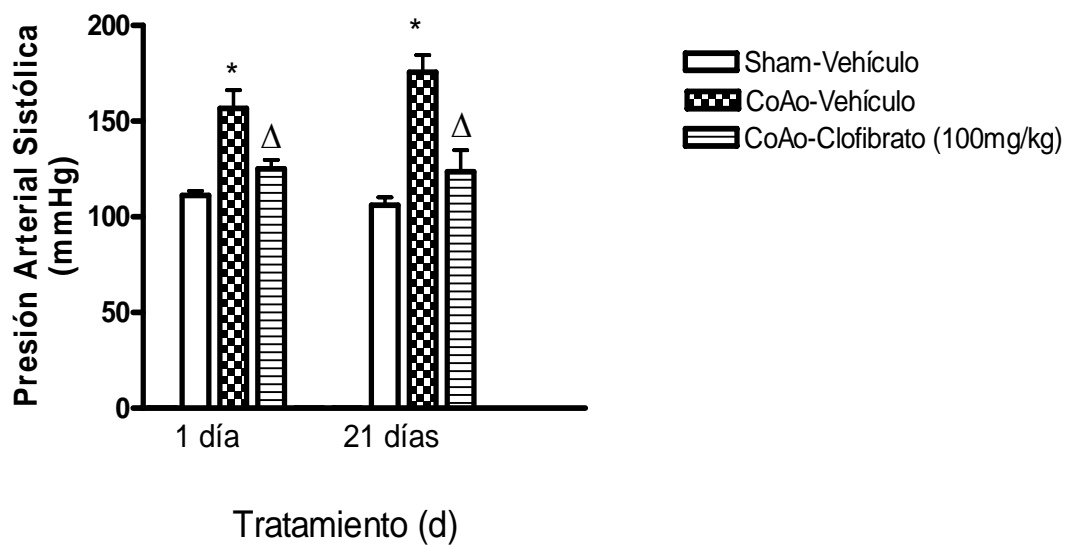
Después de 21 días de la coartación de la aorta la expresión de la eNOS en el ventrículo izquierdo es mayor en las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) comparada con las ratas falsamente coartadas (sham)  $p<0.001$  y las ratas coartadas tratadas con vehículo  $p<0.01$  (figura 11B).

En la figura 12 A observamos que la expresión de AT<sub>1</sub> en riñón hipertrófico después de 1 día de la coartación de la aorta en ratas cortadas tratadas con vehículo es mayor comparada con las ratas falsamente coartadas (sham)  $p<0.001$ . Observamos también que después de la estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100mg/kg) la expresión de los receptores AT<sub>1</sub> siguió siendo mayor en las ratas coartadas tratadas con vehículo comparada con la expresión en las ratas coartadas tratadas con el fármaco  $p<0.001$ . Después de 21 días pos coartación de la aorta observamos que la expresión de los receptores AT<sub>1</sub> en riñón hipertrófico igualmente fue mayor en las ratas coartadas tratadas con vehículo comparada tanto con las ratas falsamente coartadas  $p<0.001$  y las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg)  $p<0.001$ .

En la figura 12B observamos que la expresión de AT<sub>1</sub> en ventrículo izquierdo después de 24 horas de la coartación de la aorta en ratas tratadas con vehículo es mayor comparada con las ratas falsamente coartadas (sham)  $p<0.001$ . Después de la estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/kg) la expresión de los receptores AT<sub>1</sub> siguió siendo mayor en las ratas coartadas tratadas con vehículo que en las ratas coartadas tratadas con el fármaco  $p<0.05$ . Después de 21 días de la coartación de la aorta observamos que la expresión de los receptores AT<sub>1</sub> en ventrículo izquierdo fue mayor en las ratas coartadas tratadas con vehículo comparada tanto con las ratas falsamente coartadas (sham)  $p<0.001$  y las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg)  $p<0.05$ .

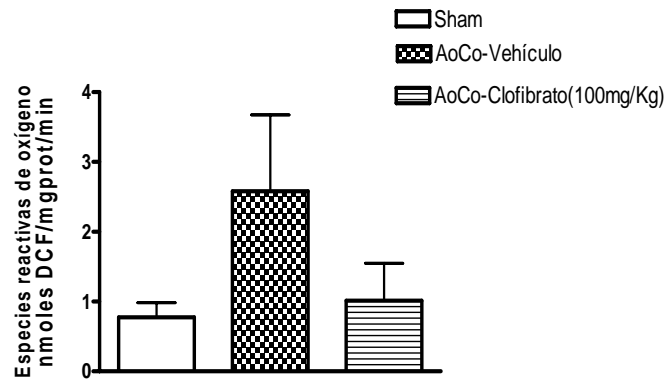
En la figura 13A observamos que la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en riñón hipertrófico después de 1 día de la coartación de la aorta es mayor en las ratas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) que la expresión del receptor observada en las falsamente coartadas (Sham)  $p < 0.001$ . La estimulación de los PPAR $\alpha$  por clofibrato (100 mg/kg) aumenta la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en las ratas tratadas con el fármaco comparada con la expresión del receptor en las ratas coartadas que únicamente han sido tratadas con vehículo  $p < 0.001$ . Después de 21 días de la coartación de la aorta las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) siguen teniendo una mayor expresión del receptor AT<sub>2</sub> comparada con la expresión observada tanto en las ratas falsamente coartadas (Sham)  $p < 0.001$  y las ratas coartadas tratadas con únicamente con vehículo  $p < 0.001$ .

En ventrículo izquierdo la expresión del receptor AT<sub>2</sub> después de 1 día post coartación de la aorta es mayor en las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) comparada tanto en las ratas falsamente coartadas (sham)  $p < 0.001$  y las ratas coartadas tratadas con vehículo  $p < 0.001$ . Después de 21 días pos coartación de la aorta la expresión del receptor AT<sub>2</sub> se mantiene aumentada en las ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) comparada tanto con las ratas falsamente coartadas (Sham)  $p < 0.001$  y las ratas coartadas tratadas únicamente con vehículo (Figura 13B).

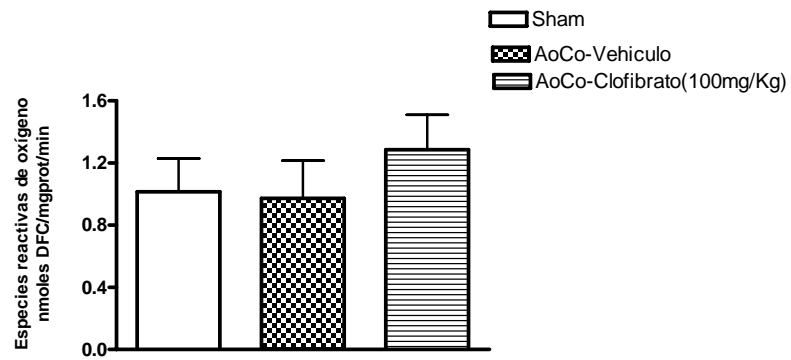


**Figura 1-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la presión arterial sistólica. La presión arterial sistólica fue medida intracarotídeamente en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n= 6 experimentos independientes.\*p <0.001 y  $\Delta$  p<0.01, Anova-Tukey

**A**

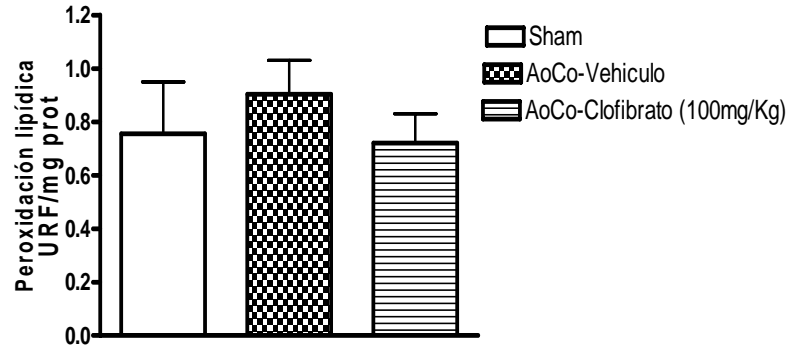
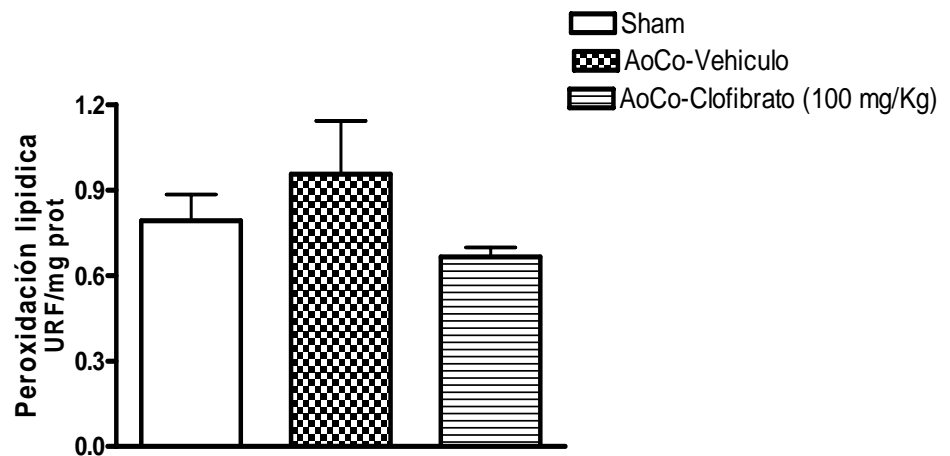


**B**

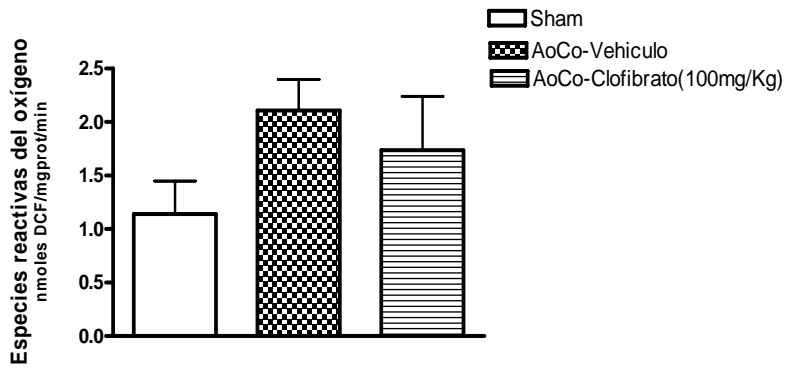
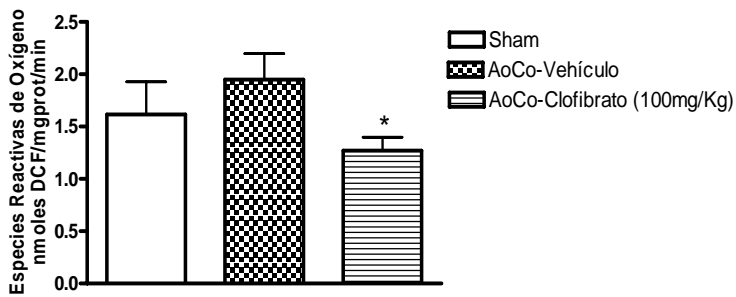


**Figura 2-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la producción de especies reactivas de oxígeno. La formación de especies reactivas de oxígeno fue medida en riñón hipertrófico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs(Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n= 6 exsperimentos independientes.



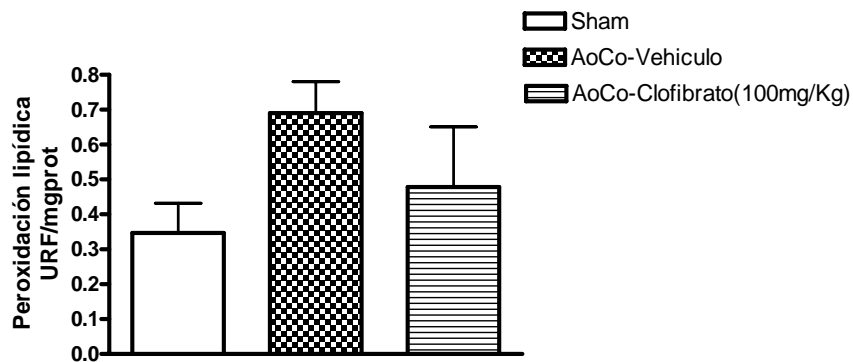
**A****B**

**Figura 3-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la producción de lípidos peroxidados. La formación de lípidos peroxidados fue medida en riñón hipertrofico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Veh) y en ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 horas (Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación de la aorta. Los datos representan el valor promedio  $\pm$  e.s. de una n= 6 experimentos independientes.

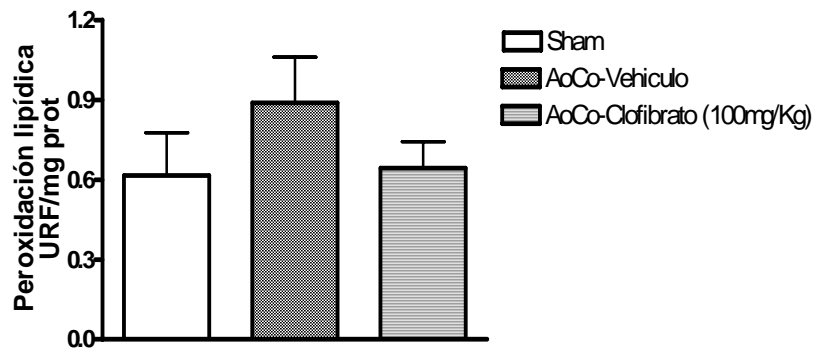
**A****B**

**Figura 4.-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la producción de especies reactivas de oxígeno. La formación de especies reactivas de oxígeno fue medida en ventrículo izquierdo en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs (Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s. de n= 6 experimentos independientes. \*p<0.05, t-Student

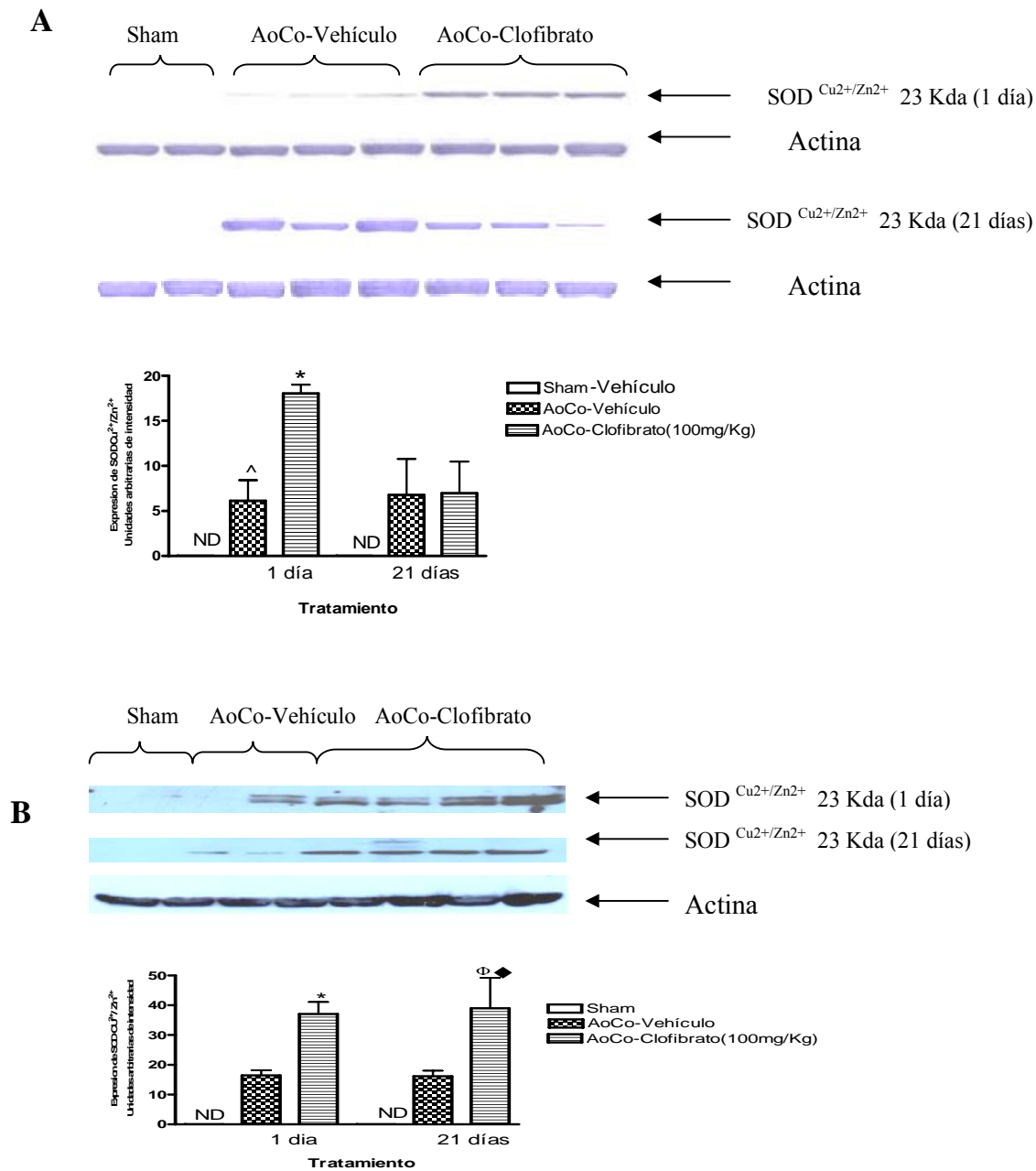
A



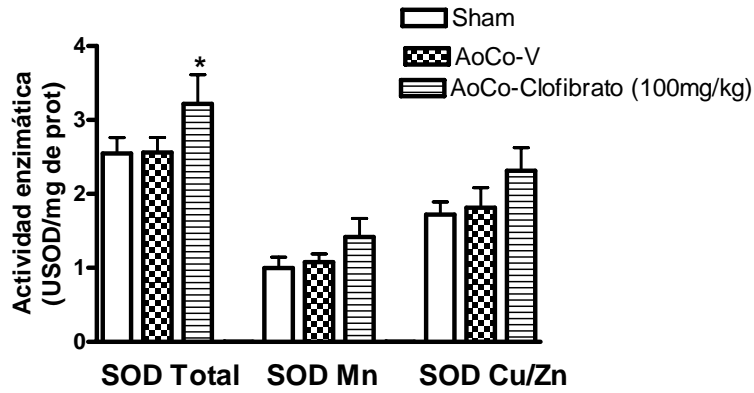
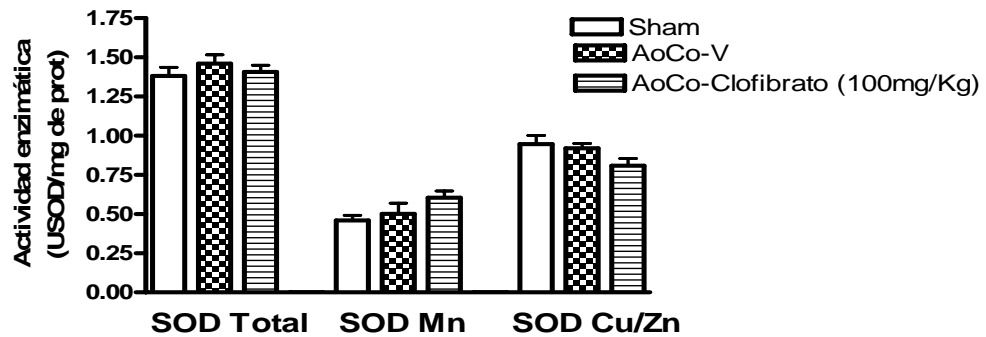
B



**Figura 5-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la producción de lípidos peroxidados. La formación de lípidos peroxidados fue medida en ventrículo izquierdo en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs (Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n=6 experimentos independientes.

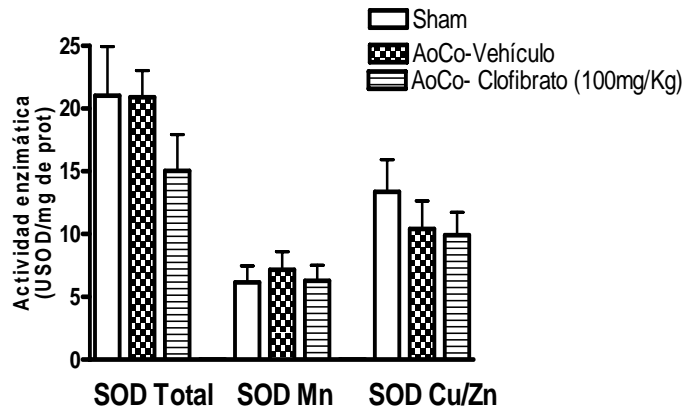


**Figura 6-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la expresión de  $\text{SOD}_{\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}}$ . La expresión de fue medida en riñón hipertrofico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs y 21 días posteriores a la coartación aórtica (figura A). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de 6 experimentos independientes \* $p < 0.01$  y  $\wedge p < 0.05$ , Anova-Tukey. La figura B muestra la expresión de la enzima en ventrículo izquierdo de ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Veh) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 horas y 21 días posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n=6 experimentos independientes \*  $p < 0.001$ ,  $\Phi p < 0.001$  y  $\blacklozenge p < 0.05$  Anova-Tukey.

**A****B**

**Figura 7-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la actividad de SODCu<sup>2+/-</sup>Zn<sup>2+/-</sup>. La actividad de la SODCu<sup>2+/-</sup>Zn<sup>2+/-</sup> fue medida en riñón hipertrófico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs ( Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n= 6 experimentos independientes. \*p<0.001 Anova-Tukey.

A

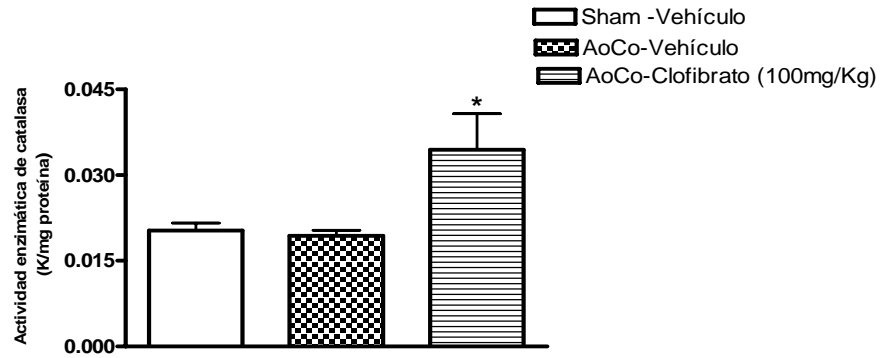


B

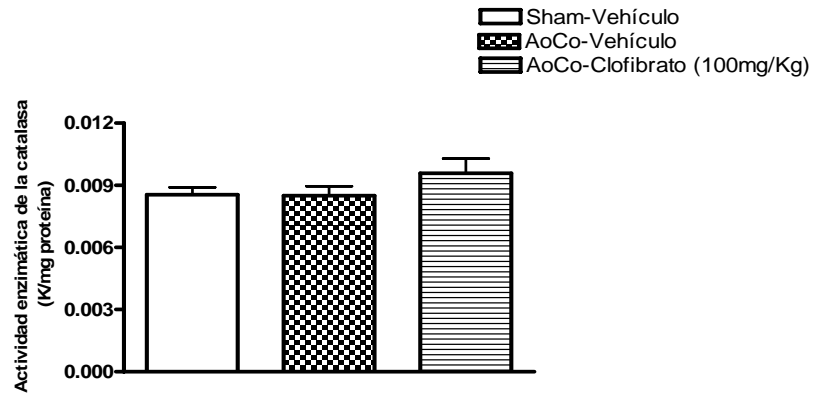


**Figura 8-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la actividad de SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>. La actividad de la SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> fue medida en ventrículo izquierdo en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs (Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n=6 experimentos independientes. \*p<0.001 Anova-Tukey.

A

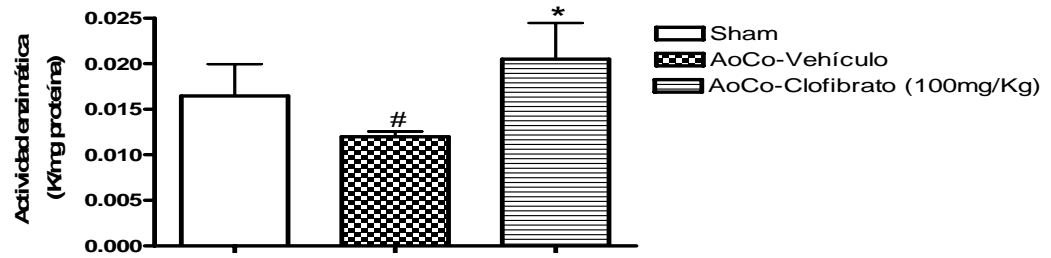


B

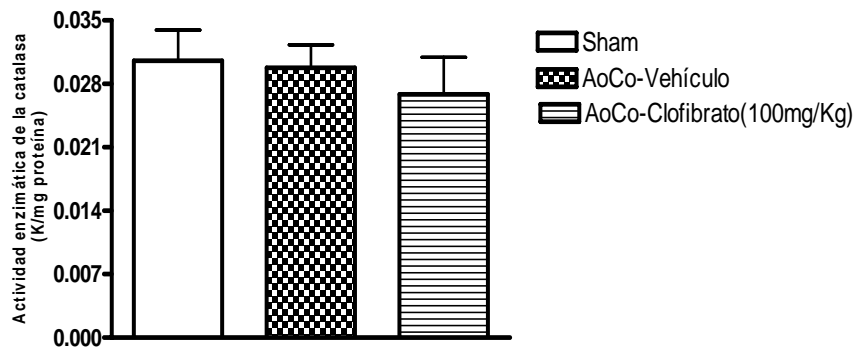


**Figura 9-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la actividad de la catalasa. La actividad de la catalasa fue medida en riñón hipertrófico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs (Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n= 6 experimentos independientes. \*p<0.05 Anova-Tukey.

A

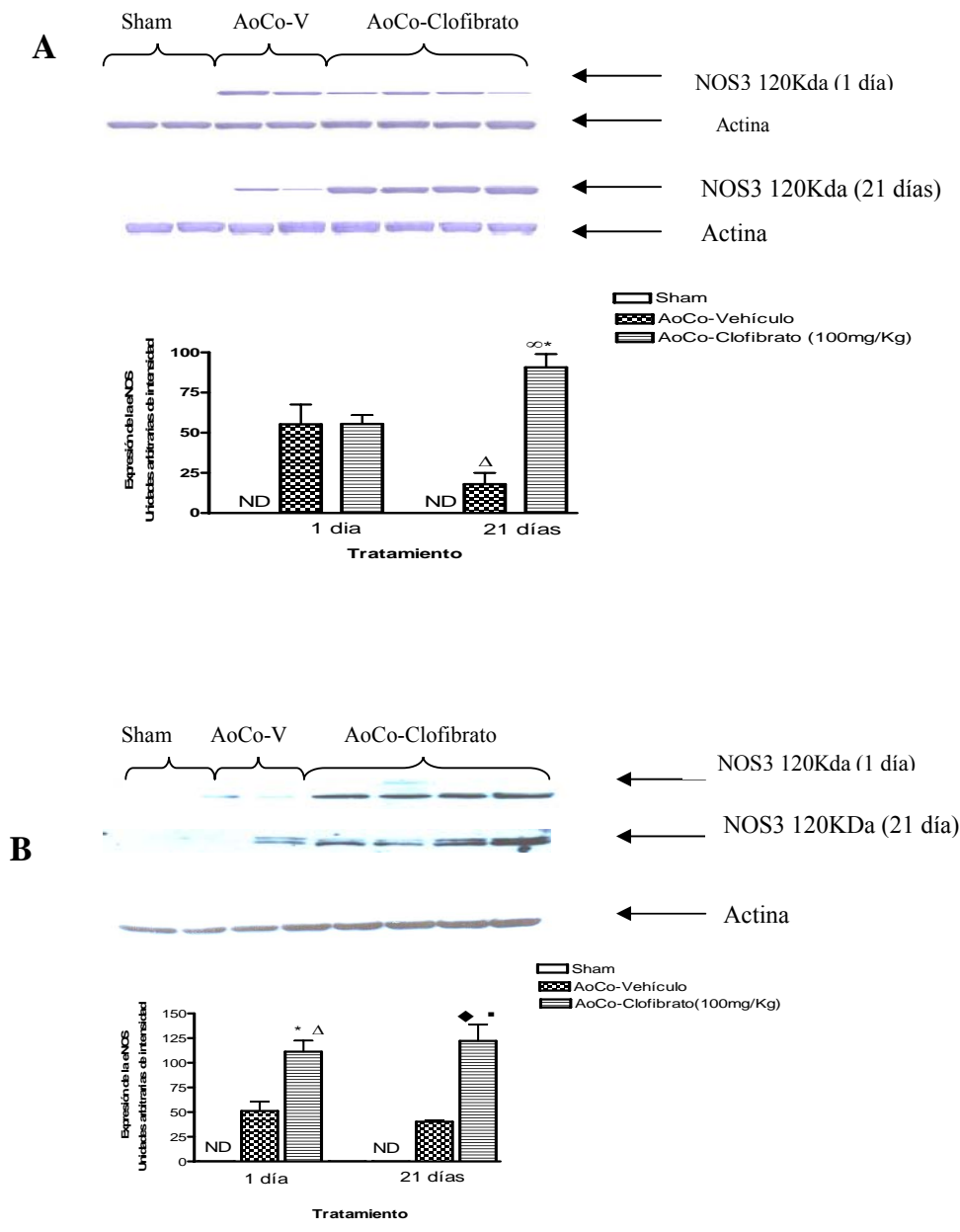


B



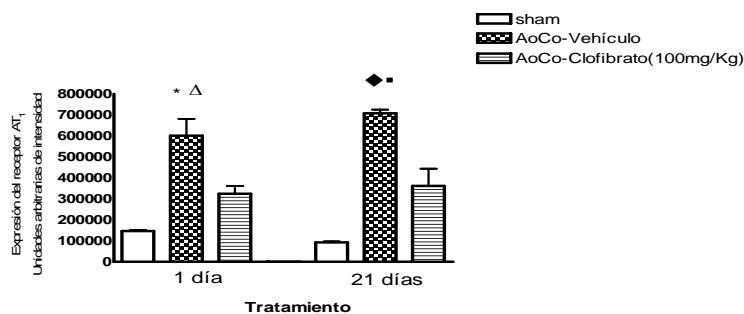
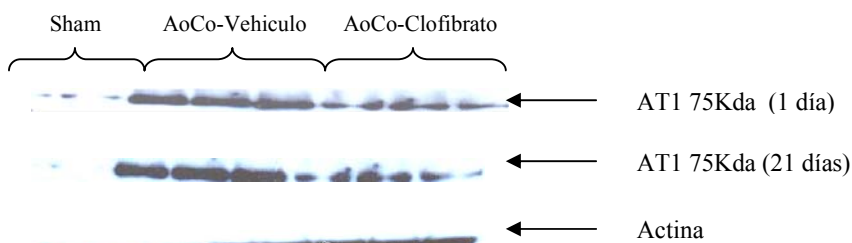
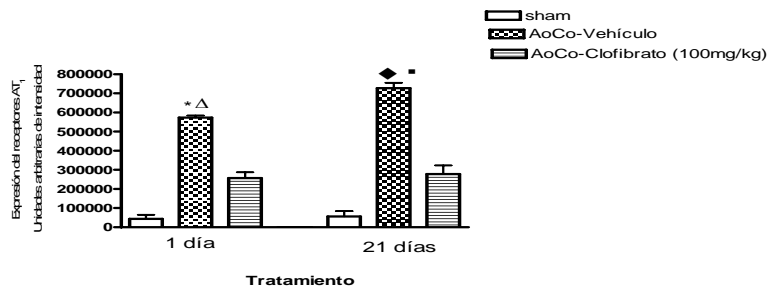
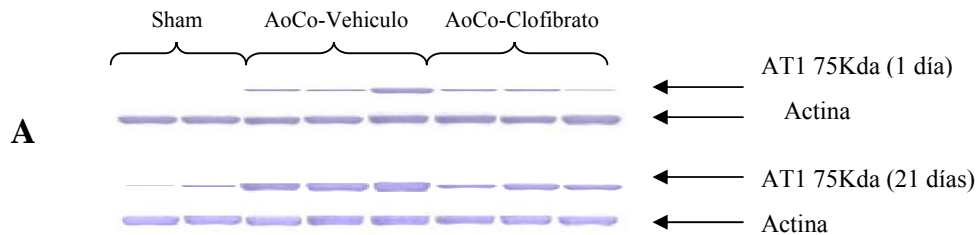
**Figura 10.-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la actividad de la catalasa. La actividad de la catalasa fue medida en ventrículo izquierdo en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs (Figura A) y 21 días (Figura B) posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de una n= 6 experimentos independientes.  
\* p =0.002 y # p=0.004 Anova-Tukey.





**Figura 11-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la expresión de eNOs. La expresión de fue medida en riñón hipertrófico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs y 21 días posteriores a la coartación aórtica (figura A). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de n= 6 experimentos independientes \*p<0.05,  $\infty$  p<0.001 y  $\Delta$ p<0.05, Anova-Tukey.

La figura B muestra la expresión de la enzima en ventrículo izquierdo de ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 horas y 21 días posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de n= 6 experimentos independientes  $\Delta$ p<0.01, \*p<0.05,  $\blacklozenge$ p<0.001 y  $\blacksquare$ p<0.01. Anova-Tukey

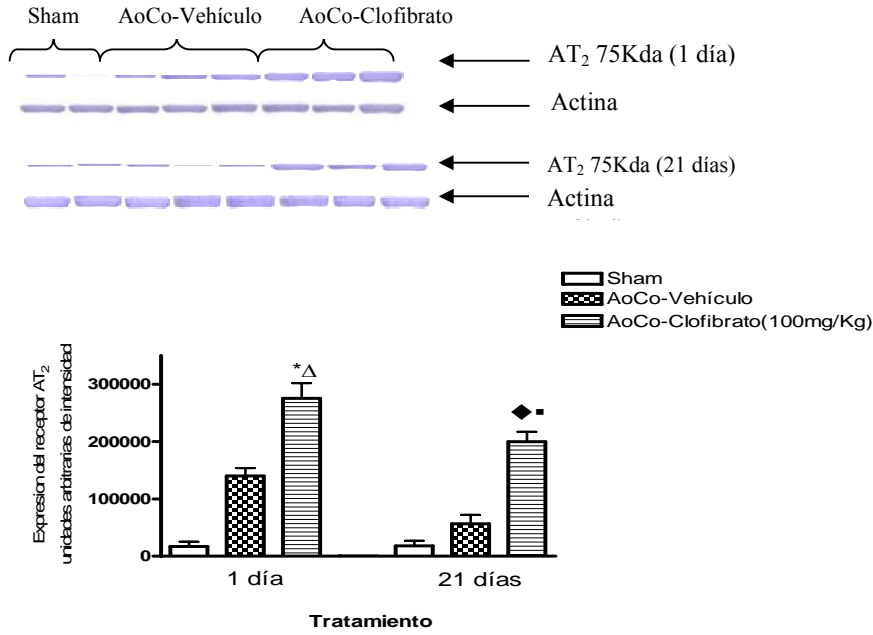


**Figura 12-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la expresión de los receptores AT $_1$ . La expresión del receptor fue medida en riñón hipertrofico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs y 21 días posteriores a la coartación aórtica (figura A). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de n= 6 experimentos independientes.

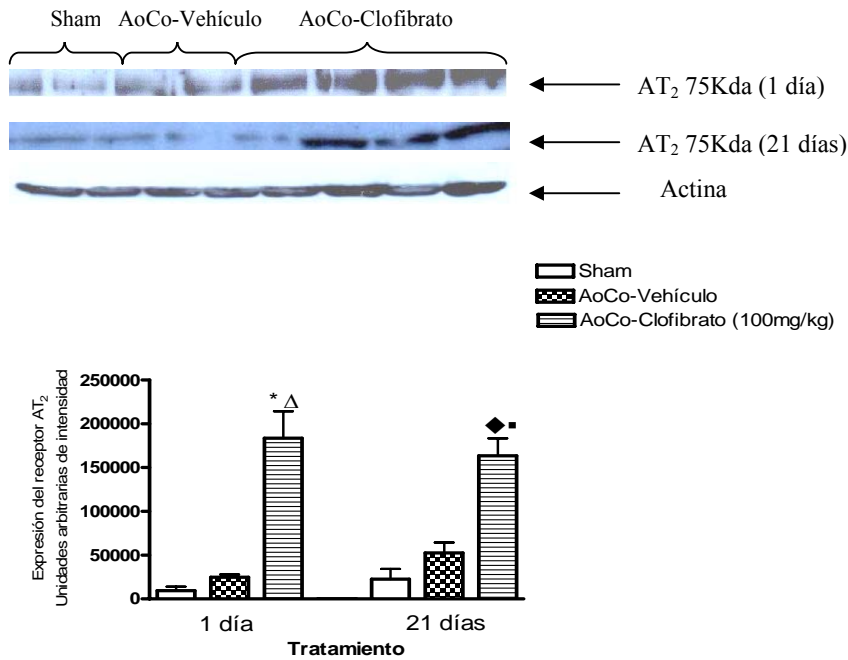
\* p < 0.001,  $\Delta$  p < 0.001,  $\blacklozenge$  p < 0.001 y  $\blacksquare$  p < 0.001 Anova-Tukey

La figura B muestra la expresión del receptor AT $_1$  en ventrículo izquierdo de ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 horas y 21 días posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s de n=6 experimentos independientes. \* p < 0.001,  $\Delta$  p < 0.05,  $\blacklozenge$  p < 0.001 y  $\blacksquare$  p < 0.05. Anova-Tukey.

A



B



**Figura 13.-** Efecto de la estimulación de los PPAR $\alpha$  sobre la expresión de los receptores AT<sub>2</sub>. La expresión de fue medida en riñón hipertrófico en ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 hrs y 21 días posteriores a la coartación aórtica (figura A). Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s. de n= 6 experimentos independientes.

\* p < 0.001,  $\Delta$  p < 0.05,  $\blacklozenge$  p < 0.001 y  $\blacksquare$  p < 0.001. Anova-Tukey.

La figura B muestra la expresión del receptor AT<sub>2</sub> en ventrículo izquierdo de ratas falsamente coartadas (sham), ratas con coartación aórtica tratadas con vehículo (AoCo-Vehículo) y ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100mg/Kg) (AoCo-Clofibrato) a las 24 horas y 21 días posteriores a la coartación aórtica. Las barras representan el valor promedio  $\pm$  e.s. de n= 6 experimentos independientes. \*p < 0.001,  $\Delta$  p < 0.001,  $\blacklozenge$  p < 0.0001 y  $\blacksquare$  p < 0.0001. Anova-Tukey

## ***VI.- Discusión de resultados***

Nuestro estudio provee evidencia de los efectos vasculares *in vivo* producidos por el activador de los PPAR $\alpha$ , clofibrato, sobre la presión arterial, ya que la administración de este fármaco por 1 y 21 días evitó el aumento de la presión arterial en ratas con coartación de la aorta así como también produjo una disminución de las especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación tanto en ventrículo izquierdo y riñón hipertrófico. Con los que respecta a las enzimas antioxidantes la isoforma SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> y la catalasa, estas aumentaron su actividad y expresión de la primera únicamente después de 1 día de la coartación de la aorta. Sin embargo la expresión de la sintasa del óxido nítrico aumentó su expresión solamente después de 21 días de tratamiento. Los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> también mostraron un aumento en su expresión desde 1 día de tratamiento con clofibrato hasta los 21 días de estimulación con el fármaco.

Existen importantes evidencias clínicas que indican que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel fisiopatológico preponderante en el desarrollo de la hipertensión (Harrison DG 1997). Esto se debe, en gran medida, al exceso de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y a la disminución en la biodisponibilidad de NO en el árbol vascular y en el riñón y al remodelado cardiovascular mediado por las especies reactivas de oxígeno (Touyz RM 2003; Chabrashvili T *et al* 2002; Kishi T *et al* 2004). Se ha demostrado que en cultivos de células de músculo liso vascular así como en arterias aisladas de ratas hipertensas y de humanos, la producción de especies reactivas de oxígeno está aumentada y la bioactividad antioxidante esta reducida (Touyz R y Schiffrin EL, 2001). Por ende, esta evidencia permite avalar el papel del estrés oxidativo en la patogenia de la hipertensión. En nuestro estudio, la prevención al incremento de la presión arterial en las ratas con coartación aórtica tratadas con clofibrato (100 mg/kg) se acompañó de una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno. Nuestros resultados muestran que en el riñón hipertrófico de ratas con coartación de la aorta con 1 día de tratamiento con clofibrato (100 mg/Kg) la producción de especies reactivas de oxígeno disminuye, observándose además, una disminución en la lipoperoxidación. Por otro lado en el ventrículo izquierdo de ratas que han sido coartadas y tratadas con el fármaco por 1 y 21 días se observa una disminución tanto de las especies reactivas de oxígeno como de los lípidos peroxidados.

Se ha demostrado por varios estudios que, el origen de las especies reactivas de oxígeno en el endotelio, adventicia y células del músculo liso derivan primariamente de la NAD(P)H oxidasa, una subunidad enzimática que cataliza la producción de  $O_2^-$  por la reducción de un electrón del oxígeno que utiliza NAD(P)H como donante de un electrón (Griendling KK y Sorescu D, 2000; Lassegue B y Clempus RE, 2003). Apoyando la teoría de que la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno predispone a la hipertensión arterial existen reportes en los cuales modelos de ratones deficientes en enzimas generadoras de ROS en especial NAD(P)H oxidasa tienen presiones arteriales bajas, en comparación con las ratones control y la infusión con angiotensina II no produce hipertensión en estos animales (Landmesser U y Cai H, 2002). En ratas espontáneamente hipertensas se han identificado varios polimorfismos en la región promotora del gen de la subunidad p22<sup>phox</sup> (Zalba G y Baeumont FJ, 2001). Este hecho tiene gran importancia clínica, debido a que se ha descrito la asociación del polimorfismo de esta subunidad y la producción de  $O_2^-$  mediada por NAD(P)H oxidasa en la pared vascular de pacientes con hipertensión (Moreno MU y San José G, 2003). El incremento en la expresión de la subunidad p47<sup>phox</sup> se ha observado en los vasos del riñón, la mácula densa y la porción distal de las nefronas de ratas jóvenes espontáneamente hipertensas, hecho que sugiere que el aumento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa renal precede al desarrollo de la hipertensión arterial (Kishi T *et al*, 2004; Fujii S *et al* 2003)

La estimulación de los PPAR $\alpha$ , por medio de sus ligandos, podría disminuir los efectos deletéreos del aumento en el estrés oxidativo. Se ha demostrado que la estimulación de los PPAR $\alpha$  por fibratos disminuye el RNAm de la NAD(P)H oxidasa en cultivos de células endoteliales humanas (Newaz M y Blanton A, 2005; Beswick RA y Dorrance AM, 2001), siendo principalmente la subunidad p22<sup>phox</sup> la que reduce la expresión de su RNAm (Inoue S y Goto T, 2001). Por lo tanto, un mecanismo por el cual el clofibrato (100 mg/kg) mejora la presión arterial en ratas con coartación aórtica incluye la disminución de las especies reactivas de oxígeno debido a una disminución en la expresión de alguna de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa.

En los mamíferos las ROS se metabolizan a  $H_2O_2$  y  $O_2$  por acción de la SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> y catalasa. Wang y colaboradores (Wang HD y Johns DG, 2002) reportaron que la sobreexpresión de SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> evita el daño por isquemia en el tejido, además se ha demostrado que esta enzima reacciona selectivamente con el radical superóxido y prolonga la vida media del NO (Pryor WA y Squadrito GL, 1995; Crow JP *et al*,

1994), por eso la importancia del estudio de esta enzima y su participación en la disminución del estrés oxidativo. Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con  $\text{SODCu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  u otros antioxidantes mejora las funciones vasculares y renales, revierte el remodelado vascular y descende la presión arterial (Rodríguez Turbe B y Zhan CD, 2003; Viridis A y Neves MF, 2004). Algunas investigaciones han demostrado (Inoue I y Goto T, 2001) que la activación de  $\text{PPAR}\alpha$  por bezafibrato aumenta la expresión génica y los niveles de proteína de  $\text{SODCu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en células endoteliales. Nuestros resultados indican que el clofibrato, activador de los  $\text{PPAR}\alpha$ , aumenta *in vivo* la actividad y la expresión de la  $\text{SODCu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en ratas con coartación aórtica que fueron tratadas por un día con la dosis de 100 mg/kg. Este evento parece depender del tiempo ya que, el tratamiento por 21 días no fue capaz de mantener el aumento en la actividad y expresión de la  $\text{SODCu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  en los órganos estudiados. Lo que nos indica la importancia de esta enzima en la disminución de ROS en las etapas tempranas del desarrollo de la hipertensión.

La catalasa está involucrada en la desintoxicación por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por lo tanto brinda protección contra el estrés oxidativo. Se ha demostrado que en el promotor del gen de la catalasa existe un elemento de respuesta a la proliferación peroxisomal (PPRE) (Mehendale H 2000) y por lo tanto la catalasa se ha identificado como una enzima blanco de los  $\text{PPAR}\alpha$ . El mal funcionamiento en la actividad de la catalasa eleva los niveles intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  el cual es permeable a la membrana celular y por lo tanto puede difundirse extracelularmente provocando daño. Tomaya y colaboradores (Tomaya *et al* 2004) han demostrado que la activación de los  $\text{PPAR}\alpha$  por fenofibrato tiene una acción antifibrótica en el modelo de cirrosis de hígado de ratas, esta acción antifibrótica debida a la acción del fenofibrato da por resultado un efecto antioxidante que aumenta la expresión y actividad de catalasa en hígado. Nuestros resultados muestran que la actividad de la catalasa se aumenta también en ratas coartadas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) durante un día, sin embargo, después de 21 días de tratamiento con clofibrato (100 mg/Kg) tanto en riñón hipertrófico como en ventrículo izquierdo la enzima no aumenta su actividad confirmando la importancia de esta enzima contra el estrés oxidativo en las etapas tempranas de la hipertensión y por lo tanto su participación en la prevención del incremento de la presión arterial.

Existen evidencias de que las ROS, tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo tienen un papel importante en el desarrollo de la hipertensión arterial. El aumento del anión superóxido posibilita su reacción con el

óxido nítrico formando peroxinitrito, con lo que disminuye la biodisponibilidad del NO y con ello sus propiedades vasoprotectoras y antiaterogénicas. El peroxinitrito es un compuesto sumamente tóxico para la célula y capaz de producir vasconstricción (Beckman JS y Koppenol WH, 1996).

Goya K y colaboradores (Goya K *et al* 2004) han demostrado que en cultivos de células endoteliales, el fenofibrato (>10 $\mu$ mol/L) induce la sobreexpresión de los niveles de proteína de eNOS y aumenta los niveles de RNAm, sin embargo el análisis de la secuencia del promotor de la eNOS humana revela que este no tiene ningún PPRE (Goya K *et al*, 2004) sugiriendo que los PPAR $\alpha$  no interaccionan directamente con la región del promotor de eNOS. Se ha propuesto que la activación de los PPAR $\alpha$  estabiliza el RNAm de la eNOS aumentando por tanto su expresión y actividad. Nuestros resultados muestran que la expresión de la eNOS se encuentra aumentada en las ratas tratadas con clofibrato (100 mg/kg) por 21 días en riñón hipertrófico y ventrículo izquierdo comparada con la expresión de las ratas coartadas tratadas con vehículo, este aumento en la expresión de eNOS sugiere que en ratas tratadas con clofibrato (100mg/kg) se estabiliza el RNAm como indican los experimentos de Goya y colaboradores; aumentando de esta manera su expresión y actividad y por lo tanto aumentando también la producción de NO lo que ayuda a mejorar el daño endotelial causado por la coartación. Este evento podría ser el responsable de la prevención del incremento de la presión arterial de las ratas coartadas tratadas con el fármaco posterior al daño en períodos sub-crónicos. Nuestros resultados además nos indican que en etapas subcrónicas posterior al daño el NO desempeña un papel muy importante en la regulación de la presión arterial y la batería antioxidante deja de tener un efecto preponderante en la disminución de la presión arterial. Nuestros resultados concuerdan con los datos obtenidos por *Taberero y Schoojans* quienes demostraron que el fenofibrato activador de los PPAR $\alpha$ , también mejora la vasodilatación mediada por NO endotelial aumentando la actividad antioxidante en los vasos sanguíneos de ratón sugiriendo el importante papel que desempeñan los PPAR $\alpha$  en la pared vascular.

La angiotensina II media sus efectos actuando a través de sus receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> por medio de los cuales regula la presión arterial. La activación del receptor AT<sub>1</sub> produce vasoconstricción, estimula la producción de superóxido, liberación de endotelina, la peroxidación de lípidos y la expresión de moléculas de adhesión, todos estos efectos fisiológicos mediados por los receptores AT<sub>1</sub> causan un aumento de la presión arterial

(Allen A y Zhuo J, 2000) . En nuestro estudio evaluamos la participación del receptor AT<sub>1</sub> mediante la cuantificación de su expresión proteica tanto en ventrículo izquierdo como en riñón hipertrófico a 1 y 21 días después de la coartación de la aorta. Nuestros resultados muestran que las ratas con coartación aórtica presentan un incremento en la expresión del receptor AT<sub>1</sub> lo cual se correlaciona con el aumento que se observa en la presión arterial. Sin embargo las ratas con coartación de la aorta que fueron tratadas con clofibrato (100 mg/Kg) no presentan este aumento en la expresión de AT<sub>1</sub>; Este hecho contribuye a la prevención del aumento de la presión arterial que se observa como efecto de la coartación.

Evidencias recientes sugieren que los receptores AT<sub>2</sub> pueden tener participación en la regulación de la presión arterial y la función renal, contraponiéndose al efecto vasoconstrictor de la AngII mediada por los receptores AT<sub>1</sub>. El significado de la estimulación de los receptores AT<sub>2</sub> en la regulación de la presión arterial ha sido propuesta por *Tsutsumi et al, 2003* quienes, usando ratones transgénicos, lograron sobreexpresar selectivamente, receptores AT<sub>2</sub> en células de músculo liso vascular y observaron que la infusión con AngII no causa respuesta presora, la cual estaba presente en los ratones silvestres. Recientemente Banks y colaboradores han demostrado que el tratamiento con clofibrato (250mg/Kg) intraperitonealmente a ratas i por 2 o 7 días modulaba el tono vasomotor, incrementando la expresión de los receptores AT<sub>2</sub> y disminuyendo la expresión de los receptores AT<sub>1</sub>. Estos hallazgos sugieren que los receptores AT<sub>2</sub> regulan la presión arterial probablemente modulando la respuesta vasoconstrictora. En general, se ha descrito que los efectos cardiovasculares del receptor AT<sub>2</sub> parecen ser opuestos a los del receptor AT<sub>1</sub>; entre ellos se encuentran: vasodilatación, inhibición del crecimiento celular y producción de óxido nítrico (Berry C y Touyz RM, 2001). Estos efectos se contraponen a los efectos producidos por el receptor AT<sub>1</sub>. En nuestros resultados el aumento de la expresión de los receptores AT<sub>2</sub> podría favorecer la disminución de la presión arterial en ratas con coartación de la aorta tratadas con clofibrato (100mg/kg) tanto en 1 como en 21 días favoreciendo la vasorrelajación en estas ratas oponiéndose al efecto vasoconstrictor realizado por AngII al interactuar con los receptores AT<sub>1</sub>.

Los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo nos conducen a entender mejor el papel que desempeña la activación de los PPAR $\alpha$  en el aumento de la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes SODCu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> y catalasa en las



etapas tempranas del desarrollo de la hipertensión y el papel que desempeña la sintasa del óxido nítrico endotelial en la prevención del desarrollo de hipertensión en las etapas tardías (sub-crónicas); así como también la participación de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en la modulación de la presión arterial en ratas con coartación aórtica.

## ***VII.- Conclusiones***

- La estimulación de los PPAR $\alpha$  por acción de clofibrato disminuye la presión arterial en la etapa aguda posterior al daño. Este efecto parece deberse a un aumento de la participación de los sistemas antioxidantes (SOD y catalasa), los cuales se activan para minimizar el daño producido por la coartación aórtica, la isquemia renal y la consecuente sobreproducción de especies reactivas del oxígeno.
- La estimulación de los PPAR $\alpha$  por acción de clofibrato disminuyó efectivamente la hipertensión arterial inducida por la coartación de la aorta tanto en 1 como en 21 días de tratamiento.
- Durante la etapa aguda (1 día) posterior a la coartación la actividad y expresión de las enzimas antioxidantes (SOD y catalasa) parecen tener una participación en la modulación de la presión arterial.
- La expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial no parece tener participación en la modulación de la presión arterial en la etapa aguda posterior a la coartación.
- Durante la fase sub-crónica de la hipertensión arterial inducida por coartación de la aorta, los mecanismos de defensa antioxidante (SOD y Catalasa) no modifican su actividad ni expresión, respecto a las ratas normotensas, en los tejidos estudiados (riñón hipertrófico y ventrículo izquierdo).

- La sintasa del óxido nítrico endotelial parece tener participación en la modulación de la presión arterial en la etapa sub-crónica posterior a la coartación; ya que la expresión de esta enzima se encuentra aumentada en este estadio de la hipertensión.
- La disminución de la presión arterial se puede también explicar por una disminución en la expresión de los receptores  $AT_1$  y un aumento en la expresión de los receptores  $AT_2$  los cuales, al ser estimulados, aumentan la vasodilatación vía NO y por lo tanto regulan efectivamente la presión arterial tanto en 1 como en 21 días.

# ***ANEXO***

## ***PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.***

### ***1.- Buffer de homogenización:***

Tris HCl (100 mM) pH 7.4: se disuelven 8.88 g de TrisHCl en 500 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl (1N).

Se agrega 10ml de NaF (0.2M) a 100 de Tris HCl (100 mM), posteriormente se agregan 5 ml de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y finalmente se agregan inhibidores de proteasas (cada tableta de Complete se debe disolver en 2 ml de agua desionizada y por cada 920 µl de buffer de lisis agregar 80 µl) .

### ***2.- Reactivo Bradford***

Adicionar a 50 ml de etanol absoluto 100 mg de azul de Coomassie y agitar hasta disolver, posteriormente adicionar 100 ml de ácido fosfórico y agitar durante 60 segundos. Aforar a 200 ml con agua desionizada, filtrar y guardar en un frasco ámbar.

### ***3.- Buffer de carbonatos en tritón X-100***

Pesar 0.8401 g de NaHCO<sub>3</sub> y disolver en 500 ml de agua desionizada. Llevar a pH de 10.2 y agregar Tritón al 0.02% hasta un volumen de 100 ml.

***4.- Solución sustrato para determinación de SOD:*** Buffer de carbonato de sodio (20 mM) pH 10.2 en tritón (0.02%) que contenga citocromo c (10 µM), azida de sodio (10 µM), xantina (100 µM) y EDTA (0.1mM). Preparar en fresco y mantener esta solución a 37° C.

***5.- Preparación de solución de xantina oxidasa:*** Preparar una solución que contenga EDTA (0.1 mM) y 3.4 mg de xantina oxidasa en 100 ml de buffer de carbonatos. Esta solución se debe mantener en hielo.

***5.- Solución patrón de acrilamida:*** Se disuelven 30 g de acrilamida y 80 g de bisacrilamida (N,N –metilen-bis- acrilamida) en agua bidestilada. Se afora a 100 ml y se almacena protegida de la luz a 2-8°C.

**6.- Solución 4X Tris-HCl/SDS pH 8.8**

Disolver 91 g de tris base en 300 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8 Aforar a 500 ml, filtrar la solución y agregar 2 g de SDS, agitar y almacenar a 4°C.

**7.- Solución 4X Tris-HCl/SDS pH 6.8**

Disolver 6.05 g de tris base en 40 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8. Aforar a 100 ml, filtrar la solución y agregar 0.4 g de SDS, mezclar y almacenar a 4°C.

**8.-Solución de corrida 4X.**

Se pesan 12.12 g de Tris-base, 57.6 g de glicina y 4 g de SDS y se disuelven en 750 ml de agua bidestilada, después se completa a 1 litro. Almacenar de 2°-8°C.

**9.- Solución amortiguadora de transferencia**

Pesar 14.4 g de glicina y 3.03 g de Tris-base, disolver en 250 ml de agua bidestilada, agregar 200 ml de metanol absoluto y aforar a 1 lt.

**10.- Solución amortiguadora de carga**

Se agrega en un tubo falcon de 50 ml los reactivos siguientes:

Agua destilada: 4 ml

Tris HCl (0.5M) pH 6.8: 1ml

SDS (10%): 0.8 ml.

Beta-mercaptoetanol: 1.6 ml

Azul de bromofenol: 0.5 ml

Se almacena a temperatura ambiente.

**11.-Solución de PBS pH 7.2**

Mezclar 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 41.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.02 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Aforar a 1 litro y ajustar pH 7.2.

**12.- Solución de bloqueo**

Disolver 5g de leche descremada en polvo en 100ml de PBS pH 7.2.

**13.- Solución de Fosfatos y Tween 20**

Se agrega a 1 litro de PBS (pH 7.2) 500µl de Tween 20.

***14.-Persulfato de amonio al 10%***

Pesar 5 g de persulfato de amonio y disolverlo en 100 ml de agua bidestilada. Guardar a 4°C.

***Preparación del sistema para transferencia de proteínas.***

Colocar los materiales siguientes en el orden que se indica:

- 1.- Papel filtro (3 cuadros previamente humedecidos en buffer de transferencia).
- 2.-Membrana PVDF (Preparada como indica el proveedor Millipore).
- 3.-Gel de acrilamida. (Conteniendo las proteínas previamente separadas por electroforesis)
- 4.-Papel filtro (3 cuadros previamente humedecidos en buffer de transferencia).

Colocar el emparedado en la unidad de transferencia

### ***VIII.- Referencias bibliográficas.***

Aebi H. Catalase activity. Methods of Enzymatic Analysis 3rd Ed. Verla Chemie, Weinheim, F.G.R. 1983

Aebi H. Catalase *in Vitro*. Methodss in enzymology. 1984; 105: 13-126

Alconrn D, Mc Causland JE, Maric C. Angiotensin receptors and development: the kidney. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1996; 23: S88 S92

Allen A. Zhuo J. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. AJH. 2000. 13:31S-38S.

Andresen J, Farici FM. Vasomotor response in MnSOD-deficient mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287:H1141-H1148.

Aranda Ana. Nuclear Hormone Receptors and Gene expression. Physiological Reviews. 2001; 81(3): 1270-1295

Baumbach GL, Didion SP. Deficiency of copper-zinc superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy. FASEB J. 2003;17:A63-A64.

Banks T, Adebayo O. Peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  activation attenuated angiotensin type1- mediated but enhanced angiotensin type2-mediated hemodynamic effects to angiotensin II in the rat. Journal of hypertension. 2008;26:468-477.

Bech-Laursen J, Somers M. Endothelial regulation of vasomotion in Apo(E)-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. Circulation. 1994;93:8736-8740

Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J et al. Kinetics of superoxide dismutase and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. Arch Biochem Biophys. 1992; 298: 438-445.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric Oxide, superoxide, and peroxynitrite the good, the bad and the ugly. Am J Physiol. 1996; 271:C1424-C1437.



- Berger J. The mechanism of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.
- Berry C, Touyz R. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H2337-H2365.
- Beswick RA, Dorrance AM. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* 2001;38:1107-1111.
- Blanc A, Pandey NR. Synchronous activation of ERK 1/2 p38<sup>mapk</sup> and PKB/Akt signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells; potential involvement in vascular disease. *International J Molec Med.* 2003;11:229-234.
- Bonnichsen R.K, Chance B. Catalase activity. *Acta Chem Scand.* 1947; 685:124-1129.
- Braissant O. Differential expression of peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) tissue distribution of PPAR-alpha, beta and gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996; 137:354-66.
- Bravo J, Gouet P. Structure of catalases. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. 1997;407-445.
- Bredt DS, Huang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450. *Nature* 1991; 351: 714-718.
- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase: a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 682-685.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 9030-9033.
- Busconi L, Mitchell T. Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem.* 1993; 269: 8410-8413.
- Cai H, Harrison CH. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.

Chabrashvili T, Tojo A, Anozato M.L. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002; 39:269-274.

Chen JD. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995;377:454-7.

Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996; 27: 154-158.

Clarke S. Peroxisome proliferators-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Clin Nutr*. 1999;70:566-71.

Cohen G, Dembiec D. Catalase. *Anal Biochem*. 1970; 34:167-189.

Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2003;60:635-642.

Cooke CL, Davidge ST. Peroxynitrite increases iNOS through NF- $\kappa$ B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol*. 2002;282:C395-C402.

Cowley A.W, Mori T. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R1355-R1369.

Crapo D, McCord J. Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods of enzymology*. 1968.41:382-391.

Crow JP, Spruell C, Chen J, Gunn C, Ischiropoulos H, Tsai M et al. On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 14: 331-338.

Cruz Mérida Aarón. Regulación normal de la presión arterial sistémica. *Rev Mex Cardiol*. 2004; 15(1): 30-41.

Darley-Usmar V, Wiseman H. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS letters*. 1995;369:131-135.

Davies MJ, Dean RT. Radical-mediated protein oxidation. Oxford University Press Oxford 1997.

Davis ME, Cai H. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol.* 2003;284:H1449-1453.

Delerive P. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Biol Chem.* 1997;274:32048-32054.

Díaz A, Rangel P. Molecular and kinetics study of catalase-1 a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Rad. Biol. Med.* 2001; 31:1323-1333.

Didion SP, Ryan MJ. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Cir Res.* 2002; 91(10):938-944.

Diep QN. PPAR $\alpha$  activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension.* 2002; 40:866-871.

Dobrain AD, Schriver SD, Khraibi AA. Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension.* 2004;43:48-56.

Droge Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002. 82:47-95.

Dupont GP, Huecksteadt TP. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1992; 89:197-202.

Durante W, Sen AK. Impairment of endothelium dependent relaxation in aorta from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1988;94:463-468.

Elphick MR, Green IC, O'Shea M. Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. *Brain Res.* 1993; 619: 344-346.

Elphick MR, Riveros-Moreno V, Moncada S. Identification of nitrergic neurons in invertebrates. *Endothelium.* 1993; 1 Suppl 57S.

- Elton T, Martin M. Angiotensin II type 1 receptor gene regulation. *Hypertension*. 2007;49:1-9.
- Esteban FJ, Pedrosa JA, Jimenez A, del Moral ML, Rodrigo J, Peinado MA. Nitroergic innervation of the cat liver. *Neurosci Lett*. 1998; 243: 45-48.
- Fajas L. The organization promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *J Biol Chem*. 2000; 275:1873-7.
- Faraci FM. Role of nitric oxide in regulation of basilar artery tone in vivo. *Am J Physiol*. 1990; 259: H1216-1221.
- Faraci FM. Regulation of the cerebral circulation by endothelium. *Pharmacol Ther*. 1992; 56: 1-22.
- Faraci FM. Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: large arteries vs microcirculation. *Am J Physiol*. 1991; 261: H1038-1042.
- Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F. Regional distribution of EDRF-NO synthesizing enzyme(s) in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 168: 727-732.
- Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD et al. Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1649-1857.
- Fujii S, Zhang L, Igarashi J. L-arginine reverse p47phox and pg91phox expression induced by salt in Dahl rats. *Hypertension*. 2003;42:1014-20.
- Fukai T, Galis ZS. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;101:2101-2111.
- Fukai T, Ishizaka N. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997;80:45-51.
- Fukai T, Siegfried MR. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res*. 1999;85:23-28.

Fukai T, Siegfried MR. Regulation of vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000;105:1631-1639.

Fukui T, Ishizaka N. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997;80:45-51.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376

Fukai T, Folz RJ. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002;55:239-249.

Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991; 14: 60-67.

Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 3491-3495.

Gelperin A. Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature.* 1994; 369: 61-63.

Giovanelli J, Campos KL, Kulman S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 7071-7093.

Gold ME, Wood KS, Buga GM, Byrns RE, Ignarro LJ. L-arginine causes whereas L-argininosuccinic acid inhibits endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 161: 536-543.

Gordon A, Anicotte JS. PPAR- $\alpha$  effects on the heart and other vascular tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H1-H9.

Gottlicher M. Fatty acid activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89:4653-57.

Gou W, Adachi T. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Physiol.* 2003; 285:H1396-H403.

Goya K, Sumitani S, Xu X, Kitamura T, Yamamoto K. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists increased nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:658-663.

Griendling K, FitzGerald G. oxidative Stress and cardiovascular injury: Part I: Basic Mechanism and In Vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912-1916.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Cir Res.* 1994; 74:1141-1148.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukay M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Cir Res.* 2000; 86: 494-201.

Griffith OW, Stuerh DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 707-736.

Gross BB, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG. Cytokine activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 170: 823-829.

Grunfeld S, Hamilton CA. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension.* 1995;26:854-857.

Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? *Cleve Clin J Med.* 2004;71:327-34.

Hednet T, Sun X. Measures of endothelial function as an endpoint in hypertension. *Blood Press Suppl.*1997;2:1732-1738.

Heinzel B, John M.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J.* 1992;281:627-6

Heitzer T, Wenzel U. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase. *Kidney Int.* 1999;55:252-260.

Hess R. Nature of hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy- isobutyrate in the rat. *Nature.* 1965; 208:856-58.

Hevel JM, White KA Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1991; 266: 22789-22791.

Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. El concepto actual del sistema renina-angiotensina. *Rev Inv Clin.* 1993; 45: 165-177.

Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Renina: estructura y regulación de la expresión del gen, biosíntesis y vías celulares de secreción. *Rev Inv Clin.* 1993; 45: 255-266.

Iglarz M, Touyz RM. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and- $\gamma$  activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Throb Vasc Biol.* 2003;23:45-51.

Inoue I, Goto T. The ligands/activators for peroxisomal proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and PPAR $\gamma$  increase  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  superoxide dismutase and decrease p22hox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism.* 2001;50:3-11.

Inoue N, Ramasamy S. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1996;79:32-37.

Inoue S, Noji T. Bezafibrate has an antioxidant effect:peroxisome proliferator-activated receptor is associated with  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  superoxide dismutase in the liver. *Life Sci.* 1998;63:135-144.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 298: 431-437.

Jialal I, Devaraj S. Antioxidant and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. *Circulation*. 2003;107:926-28

Juge- Aubry C. DNA binding properties of peroxisome proliferators-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1997;272: 25252-9.

Kerwin JF Jr, Lancaster JR, Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem*. 1996; 38: 4343-4463.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal disease. *Pharmacol Rev*. 2003; 52(1): 12-34.

Kishi T, Hirooka Y, Kimuya Y. Increased reactive oxygen species in ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2004;109:2357-2362.

Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics*. 1992; 14: 802-804.

Kliwer SA. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferators signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992; 358:771-4.

Kliwer SA. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferators activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94; 83:4318-23.

Klotz MG, Klassen GR. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol*. 1997;14:951-958.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem J*. 1990; 269: 207-210.

Kota PB, Hsun-Wei T. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005;51: 85-94.



Lancaster JR .Stimulation of the diffusion and reaction of endogeneously produced nitric oxide. Implications for neural nitric oxide signaling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*. 1994; 33: 1235-1244.

Landmesser U, Cai H. Role of p47 (phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002;40:511-515.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncloupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111:1202-1209.

Landmesser U, Merten R. Vascular extracellular superoxide activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*. 2000;101:2264-2270.

Lassegue B, Clempus R. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003. 285: R277-297.

Laudet V. Evolution of the nuclear receptor gene super family. *EMBO J* 1992;11:1003-13.

Laughlin MH, Welshons WW. Gender exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J Appl Physiol*. 2003;95:250-264.

Laursen JB, Rajagopalan S. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997;95:588-593.

Laursen JB, Somers M. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice. Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282-1288.

Lavigne MC, Malech HL. Genetic demonstration of p47phox-dependent superoxide anion production in murine vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2001; 104:79-84.

Lemberger T. Peroxisome proliferators activated receptors: a nuclear receptor signaling in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:335-63.

Li L, Fink GD. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin (A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003;107:1053-1058.

Lledías F, Hansberg W. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol*. 2000 .319: 110-119.

Lledías F, Rangel P. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 1998; 273:407-445.

Lockette W, Otsuka Y. The loss of endothelium-dependent relaxation in aorta from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 1988;94:463-468.

Lowenstein DJ, Alley LW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 9730-9734.

Luscher TF. Endothelium-derived nitric oxide: the endogeneous nitrosodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J*. 1991; 12: E2-E11.

Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Bio Chem*. 1992; 267: 6370-6374.

MacMillan-Crow LA, Cruthirds DL. Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radical Res*. 2001;34:325-336.

Madej A. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1998;36:345-349.

Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tomboulian F. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by peroxynitrite microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 1076-1082.

Mangelsdorf DJ. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev*. 1992; 6:329-44.

Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isozymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984;222:649-655.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268: 12231-12234.

Marnett LJ, Plataras JP. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics* . 2001. 17:214-221.

Marx N. PPAR $\alpha$  activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation.* 1999;99:3125-3131.

Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide in an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci.* 2003;92:1-6.

McCleverty JA. Reactions of nitric oxide coordinated to transition metals. *Chem Rev* 1979; 79: 53-76.

McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic Function for erythrocyte. *Journal Biol Chem* 1969. 244:6049-6055.

McCord JM. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985. 17: 159-162.

Mehendale H. PPAR $\alpha$ : a key to the mechanism of hepatoprotection by clofibrate. *Toxicological Science.* 2000; 57:187-190.

Mitchell JA, Förstermann U, Warner TD, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F. Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1417-1423.

Miura H, Bosnjak JJ. Role of hydrogen peroxide in flow-induced dilatation of human coronary arterioles. *Circ Res.* 2003;92:e31-e40.

Moncada S, Palmer RJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.

Moreno M.U, San José G, Orbe J. Preliminary characterization of the promoter of the human p22phox gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett.* 2003;542:27-31.

Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML et al. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 445-456.

Mugge A, Elwell JH. Release of intact endothelium derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1991;260:C219-C225.

Nakane M, Mitchell J, Förstermann U, Murad F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1396-1402.

Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Förstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316: 175-180.

Nakazono K, Watanebe N. Does superoxide underlie the patogénesis of hipertensión? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 10045-10048.

Navar G, Ichichara A. Nitric oxide-angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension. *Acta Physiol Scand.* 200;168:139-147.

Newas M.A , Ranganna K. Relationship between PPAR $\alpha$  activation and NO on proximal tubular Na<sup>+</sup> transport in the rat. *BMC Pharmacol.* 2004; 4:2223-2231.

Newaz M, Blanton A. NAD(P)H oxidase/nitric oxide interactions in peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\alpha$  mediated cardiovascular effects. *Mutation Research*. 2005;579:163-171.

Nishikawa T, Edelstein D. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature*. 2000;404:787-790.

Nishiyama A, Yao L, Nagai Y. Possible contribution of reactive oxygen species and mitogen activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*. 2004;43:841-48.

Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem*. 2000; 74: 785-791.

Oparil S. Pathogenesis of hypertension. *The Heart and Cardiovascular System* 2<sup>o</sup>ed, 1992. Williams and Wilkins Capítulo 13.

Oury TD, Day BJ. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*. 1996;75:617-636.

Oyama Y, Kawasaki H. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 1986;132:75-78.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.

Parcker L, *Methods in enzymology*, Volume 349. San Diego, Calif. Academic Press;2002.

Park JB, Touyz RM, Chen X. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2002;15:78-84.

Parravicini TM, Chrissobolis S, Drumond GR. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke*. 2004; 35:584-89.

Passerini AG, Polacek DC. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profile in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:2482-2487.

Pleschke JM, Kleczkowska HE. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*. 2000. 275:40974-40980.

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HW, Nakane M et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 10480-10484.

Pou S, Pou WS. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992; 267:24173-24176.

Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;268: L699-L722.

Rajagopalan S, Kurz S. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1916-1923.

Rendón J, Oliva MR, Tormos C. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hipertensión. *Hypertension*. 2003;41:1096-1101.

Rocks AJ, Van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH. Angiotensin (1-7) is a modulator of the human renin -angiotensin system. *Hypertension*. 1999;34:296-301.

Rodrigo J, Springall D, Uttenthal LO, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V et al. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B* 1994; 345: 175-221.

Rodriguez Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003;41:341-346.

Rubbo H, Radi R, Trujillo R, Ralysnaraman B, Barnes S, Kirk M et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-26075.

Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991; 291: 145-149.

Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur J Biochem.* 1997; 245(3):541-548.

Sansdrom J, Carlsson L. The heparin- binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *J Biol Chem.* 1992;267:18205-18202.

Schieffer B, Luchtefeld M. Role of NADPH oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res.* 2000; 87:1195-1201.

Schiffrin E, Amiri F. Peroxisome proliferator-activated receptors vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension.* 2003;42(part2):664-668.

Schmidt HW, Murad F. Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181: 1372- 1377.

Schnackenberg Cg, Weich WJ. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998;32:59-64.

Schutz S, Le Moullec J-M, Corvol P, Gase J-M. Early expression of all the components of the renin-angiotensin system in human development. *Am J pathol.* 1996; 149:2067-2079.

Sessa WC, Harrison JK, Luthin DR, Pollock JS, Linch KR. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* 1993; 21: 934-938.

Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res.* 1994; 31(3):131-143

Shanmugam S, Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int.* 1996; 20: 169-176.

Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003;41:266-273.

Shaw AW, Vosper AJ. Solubility of nitric oxide in aqueous and non-aqueous solvents. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1977; 8: 1239-1244.

Sobey CG, Heistad DD. Mechanism of bradykinin-induced cerebral vasodilatation: evidence that reactive oxygen species activate K<sup>+</sup> channels. *Stroke.* 1997; 28:2290-2295.

Somers MJ, Mavromatis K. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* 2000; 101:1722-1728.

Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merret M. et al. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry.* 1992; 98: 259-266.

Stralin P, Karlsson K. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Throb Vasc Biol.* 1995;15:2032-2036.

Stralin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell ECSOD expression. *Am J Physiol.* 2001;281:H1621-H1629.

Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1992; 65: 287-346.

Suzuki H, Swee A. *In vivo* evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 1995;25:1083-1089.



Suzuki K, Nakazato K. The role of oxidative stress on pathogenesis of hypertensive arterial lesions in rat mesenteric arteries. *Acta Histochem Cytochem.* 2002;35:287-293.

Swei A, Lacy F. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension.* 1997;30:1628-1633.

Tabernero A, Schoonjans. Activation of the peroxisome proliferator activated receptor protects against myocardial ischemic injury and improves endothelial vasodilatation. *BMC Pharmacol.* 2002;2:1-10.

Tanito M, Nakamura H, Kwon YW. Enhanced oxidative stress and impared thioedoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxidant Redox Signal.* 2004;6:89-97.

Tomaya Y, Hideki N, Yuichi H, Norihito Y. PPAR $\alpha$  ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:697-704.

Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003;42:1075-1081.

Touyz RM, Schiffrin E. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4): 639-672.

Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current hypertension reports.* 2000 2:98-105.

Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003; 1:91-103.

Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(9): 1001-1015.

Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase sensitive pathways. *J Hypertens.* 2001;19:1245-1254.

Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox dependent signaling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:860-866.

Uddin M, Yang H. Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:811-817.

Vanhouste PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension.* 1989; 13: 658-667.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:9220-9225.

Vaziri ND, Wang XQ. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes hypertension in normal rats. *Hypertension.* 2000;36:142-146.

Veerareddy S, Cooke CL. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol.* 2004;287(4):H40-45.

Virdis A, Neves MF. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alteration in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens.* 2004;22:535-542.

Viridis A, Fritsch Neves. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40:504-510.

Wahli W. Peroxisome proliferators activated receptors transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol.* 1995; 2:261-6.

Wang HD, Johns DG. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II *Am J Physiol.* 2002;282:H1697-702.

Werman A. Ligand independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). Differential activity of PPAR $\gamma$  and 2 isoformas and influence of insulin *J Biol Chem.* 1997;272:20230-5.

Willson TM. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J. Med Chem.* 2000;43:527-50.

Winquist RJ, Bunting PB Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand hypertensive rats. *J Hypertens.* 1984;2:541-545.

Wintor E.M.: The renin-angiotensin System and the development of the kidney. *Trend Endocrinol Metab.* 1997;8: 199-207.

Wright CD, Mülsch A, Busse R, Oswald H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 160: 813-819.

WSolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1430-1442.

Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992; 256: 225-228.

Xu L. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:140-7

Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics.* 1994; 21: 419-422.

Xu W, Gorman P, Sheer D, Bates G, Kishimoto J, Liu L Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS 1) to 12q24.2-24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogene Cell Genet.* 1993; 64: 62-63.

Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem.* 1991; 266: 12544-12547.

Zalba G, Baeumont FJ. Polymorphisms and promoter overactivity of the p22(phox) gene in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 2001;88:217-22.

Zalba G, San José G, Beaumont FJ. Polymorphisms and promoter overactivity of the p22(phox) gene in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 2001;88:217-22

Zanetti M, Sato J. Gene transfer manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. *Human Gene Therapy*. 2001;12:1407-1416.

Zanetti M, Sato J. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol*. 2001;280:H2516-H2523.

Zelko IN, Mariani TJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD-1), Mn-SOD (SOD-2), and ECSOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med*. 2002;33:337-349.

Zhang H, Schmeisser A. Angiotensin II- induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH/NADPH-oxidase. *Cardiovasc Res*. 1999; 44:215-222.

Zhu L, Gunn C, Beckman JS. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 298: 452-457.

Zhu Y. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferators activated receptor . *J Biol Chem*. 1997;272:25500-6.

Zou M-H, Shi C. Oxidation of zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109:817-826.