



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.

**PARTICIPACIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN LA REGULACIÓN DEL
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA
HIPERTENSIÓN ARTERIAL PRIMARIA EN LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CARMEN GUADALUPE MONDRAGÓN HUERTA

TUTOR PRINCIPAL: DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL ROCÍO BAUTISTA PEREZ
FACULTAD DE MEDICINA.

DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014.

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 24 de marzo de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MONDRAGÓN HUERTA CARMEN GUADALUPE**, con número de cuenta 99513164, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PRIMARIA EN LA RATA."**, realizada bajo la dirección de la **DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**:

Presidente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Vocal: DRA. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ
Secretario: DRA. MARÍA DEL ROCÍO BAUTISTA PÉREZ
Suplente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
Suplente: DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de mayo de 2014.-

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y el apoyo recibido durante todo el transcurso de estos.

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido a través de la beca que me otorgo para la realización de mis estudios de maestría.

Agradecemos a los apoyos recibidos por medio de los proyectos CONACYT 102022, PAPIIT IN223009 UNAM y PAPCA 2009-2010 FES Iztacala UNAM, que hicieron posible el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a los miembros del comité tutorial.

Dr. Maximilano Ibarra Barajas

Dra. María del Rocío Bautista Pérez

Dr. Rafael Villalobos Molina

Quienes aportaron valiosos comentarios y sugerencias, durante el desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A Dios por el don de la vida y por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de mi existencia, en especial por darme la fortaleza para terminar esta etapa profesional.

Al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su enseñanza, paciencia y guía en todo momento.

A los miembros del jurado el Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, la Dra. Ana Lilia García Hernández, la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval y la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por la revisión del escrito y los comentarios realizados para la mejora del mismo.

A mis profesores del posgrado en ciencias biológicas por sus enseñanzas y dedicación en la impartición de conocimiento.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por apoyarme con el uso de equipo de su laboratorio en el desarrollo de esta investigación.

A la Histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata por su asesoría en el desarrollo de tinciones y técnica histológica.

A la M en C. Damaris Ilhuicatzí Alvarado por su amistad y apoyo técnico en la realización de este proyecto.

A mis compañeras y compañero de laboratorio Marian Martínez Cruz, Itzel Cervantes Frías e Iván Bautista por su amistad y apoyo cada día.

Un especial agradecimiento a todos los integrantes de mi familia, sobre todo a mi mamá María del Carmen Huerta Reyes, mi papá Pedro Mondragón López y mis hermanos Pedro, Pablo y Luz María por su cariño y su apoyo incondicional en todo momento.

INDICE

1.	ABREVIATURAS	10
2.	INDICE DE FIGURAS.	12
3.	RESUMEN	14
4.	ABSTRACT	16
5.	INTRODUCCIÓN.	18
5.1.	Hipertensión arterial.	18
5.2	Sistema renal	19
5.2.1.	Estructura y función.	19
5.3.	Sistema renina-angiotensina.	23
5.3.1.	Componentes del sistema renina-angiotensina.	24
5.3.1.1.	Renina.	24
5.3.1.2.	Angiotensinógeno.	26
5.3.1.3.	Enzima convertidora de angiotensina (ACE).	27
5.3.1.4.	Peptidos de angiotensina.	28
5.3.1.5.	Receptores de Ang II.	29
5.3.2.	Funciones del sistema renina-angiotensina.	30
5.4.	Ciclooxigenasa.	32
5.4.1.	Estructura proteica de la ciclooxigenasa.	34
5.4.1.1.	Estructura del sitio activo ciclooxigenasa.	37

5.4.1.2.	Estructura del sitio activo peroxidasa.	38
5.4.2.	Regulación de la expresión de la ciclooxigenasa.	39
5.4.3.	Prostanoides derivados de ciclooxigenasa.	41
5.4.4.	Contribución de la COX a la patogénesis de la hipertensión.	43
6.	ANTECEDENTES.	45
7.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	46
8.	HIPÓTESIS.	48
9.	OBJETIVOS	48
9.1.	Objetivo General.	48
9.2.	Objetivos particulares.	48
10.	METODOLOGÍA.	49
10.1.	Material Biológico.	49
10.2.	Reactivos.	49
10.3.	Evaluación de la presión arterial.	49
10.4.	Disección y perfusión del riñón.	50
10.5.	Aislamiento del RNA y Reveso transcripción (RT).	50
10.6.	PCR en tiempo real.	50
10.7.	Inmunolocalización de COX-2 y renina en corteza renal de WKY y SHR.	52
10.8.	Administración de celecoxib y captopril.	53
10.9	Análisis de resultados.	53
11.	RESULTADOS.	54

11.1.	Cambios en los niveles del mRNA de las COXs y renina en el curso temporal de la hipertensión arterial.	54
11.1.1.	La presión arterial aumenta en las SHR a partir de las 8 semanas de edad. . . .	54
11.1.2.	El RNA obtenido tiene la integridad adecuada para evaluar cambios en el RNAm.	55
11.1.3.	Los productos de la PCR tienen el tamaño esperado de acuerdo al diseño de los primers.	55
11.1.4.	Los niveles de RNAm de COX-1, COX-2 y renina sufren modificaciones dependientes de la edad en la corteza renal de WKY y SHR.	56
11.2.	El tratamiento con celecoxib y captopril modifica las COX y renina en ratas con inicio de hipertensión arterial.	59
11.2.1.	El tratamiento con captopril previno el aumento de la presión arterial en las ratas SHR.	59
11.2.2.	El tratamiento con celecoxib y captopril modifica los niveles de mRNA de COX-2 y renina, pero no de COX-1 en corteza renal de WKY y SHR.	60
11.2.3.	El tratamiento con celecoxib o captopril modifica la presencia de la proteína de COX-2 y renina detectada por inmunolocalización en la corteza renal de WKY y SHR.	62
12.	DISCUSIÓN.	68
13.	CONCLUSIONES.	75
14.	REFERENCIAS.	76

1. ABREVIATURAS.

AINEs	Antiinflamatorios no esteroides.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
Ang I	Angiotensina I.
Ang II	Angiotensina II.
AP-2	Factor de transcripción AP-2.
AT₁	Receptor de angiotensina-1.
AT₂	Receptor de angiotensina-2.
C/EBP	Factor de transcripción C/EBP.
COX	Ciclooxigenasa.
COX-1	Ciclooxigenasa -1.
COX-2	Ciclooxigenasa -2.
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico.
Ct	Ciclo umbral
DEPC	Dietil pirocarbonato.
DNAc	DNA complementario.
DP	Receptor membranal de prostaglandina D ₂ .
ECA	Enzima convertidora de angiotensina.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EP1, EP2, EP3 y EP4	Receptores membranales de prostaglandina E ₂ .
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FP	Receptor membranal de prostaglandina F _{2α} .
GFR	Tasa de filtración glomerular.
HTA	Hipertensión arterial.
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.
IP	Receptor membranal de prostaglandina I ₂ .
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos.
MBD	Dominio de unión a membrana.
mPGE1	Sintasa 1 microsomal de PGE.
NaCl	Cloruro de sodio.

NFAT	Factor Nuclear de células T Activadas.
NF-κB	Factor nuclear κB.
PAD	Presión arterial diastólica.
PAS	Presión arterial sistólica.
PBS-DEPC	Amortiguador de fosfatos tratado con DEPC.
PEA3	Factor de transcripción PEA3.
PGD₂	Prostaglandina D ₂ .
PGDS	Prostaglandina D sintasa.
PGE₂	Prostaglandina E ₂ .
PGES	Prostaglandina E sintasa.
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α} .
PGFS	Prostaglandina F sintasa.
PGG₂	Prostaglandina G ₂ .
PGH₂	Prostaglandina H ₂ .
PGI₂	Prostaglandina I ₂ ó prostaciclina.
PGIS	Prostaglandina I sintasa.
PKC	Proteína cinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PPAR	Receptor activado por peroxisoma.
PPARγ	Receptor activado por peroxisoma γ .
PPARδ	Receptor activado por peroxisoma δ .
RAS	Sistema renina-angiotensina.
RBF	Flujo sanguíneo renal.
RNA_m	RNA mensajero.
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas.
SP-1	Factor de transcripción SP-1.
TP	Receptor membranal de tromboxano.
TXA₂	Tromboxano A ₂ .
WKY	Ratas normotensas wistar kyoto.

2. INDICE DE FIGURAS.

	Pag.
Esquema 1. Detalles estructurales del glomérulo.	21
Esquema 2. Diagrama de una nefrona yuxtamedular.	22
Esquema 3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona.	32
Esquema 4. Mecanismo de síntesis de prostaglandinas.	34
Esquema 5. Estructura cristalizada de la COX.	35
Esquema 6. Ubicación del sitio activo de la ciclooxigenasa.	36
Figura 1. Presión arterial sistólica de ratas WKY y SHR evaluada en las edades experimentales.	54
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total obtenido de la corteza renal.	55
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los genes evaluados.	55
Figura 4. Niveles de RNAm de COX-1 en corteza renal de ratas SHR y WKY de las edades experimentales.	57
Figura 5. Niveles de RNAm de COX-2 en corteza renal de ratas SHR y WKY de las edades experimentales.	58
Figura 6. Niveles de RNAm de renina en corteza renal de ratas SHR y WKY de las edades experimentales.	58

Figura 7.	Presión arterial de ratas WKY y SHR a las 8 semanas de edad tratadas con celecoxib o captopril.	59
Figura 8.	Niveles de RNAm para COX-1 en ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib.	60
Figura 9.	Niveles de RNAm para COX-2 en ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib.	61
Figura 10.	Niveles de RNAm para renina en ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib.	61
Figura 11.	Localización de la proteína COX-2 por inmunofluorescencia en corteza renal de ratas WKY y SHR tratadas con celecoxib y captopril.	63
Figura 12.	Porcentaje de glomérulos con células de la mácula densa positivas a la proteína de COX-2 de ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib.	64
Figura 13.	Localización de la proteína renina por inmunofluorescencia en corteza renal de ratas WKY y SHR tratadas con celecoxib y captopril.	65
Figura 14.	Porcentaje de glomérulos con células yuxtglomerulares positivas a la proteína de renina, de ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib.	66
Figura 15.	Estructura de un corte histológico de corteza renal de WKY de 6 semanas de edad.	67

3. RESUMEN.

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima responsable de la regulación de los sistemas renal y cardiovascular a través de la formación de prostanoïdes y de su influencia sobre el sistema renina-angiotensina (RAS, por sus siglas en Inglés), el cual tiene un papel crucial en el control de la presión sanguínea sistémica. Hay evidencia de que la COX-2 expresada en la *mácula densa* puede modular la expresión de renina yuxtglomerular, así como hay evidencia de la regulación de la expresión de COX-2 por múltiples componentes del RAS; sin embargo, también hay estudios que sugieren que bajo diferentes condiciones, la regulación de ambas enzimas ocurre de manera independiente. En este trabajo se estudió el papel de COX-1, COX-2 y renina durante el inicio y desarrollo de la hipertensión arterial primaria, en el modelo de hipertensión genética SHR y se determinó, mediante la inhibición de COX-2 con el fármaco celecoxib o de la enzima convertidora de angiotensina, el iECA captopril, su participación en la regulación de la expresión de renina y la elevación de la presión arterial. Se midió la presión sanguínea y la expresión del RNA mensajero (RNAm) para COX-1, COX-2 y renina en la corteza renal de ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) y SHR de 6 y 8 semanas, así como de 3 y 5 meses y posteriormente a ratas prehipertensas de 6 semanas de edad, administradas con celecoxib (1mg/Kg/día) y captopril (30mg/Kg/día) por dos semanas. También se evaluaron COX-2 y renina mediante el porcentaje de glomérulos positivos a la proteína por la técnica de inmunohistoquímica. La presión arterial aumentó en las SHR a partir de las 8 semanas de edad, mientras que en las WKY se mantuvo en el rango normal en todo el experimento. Los cambios en la expresión renal del RNAm para COX-1, COX-2 y renina fueron complejos, ya que no se encontró relación entre las diferentes enzimas, ni con la presión arterial. Los niveles de RNAm de COX-1, COX-2 y renina son dependientes de la edad en ratas WKY y SHR, siendo mayores en edades tempranas. A las 6 semanas de edad, cuando las SHR aún son

normotensas, se observó disminución de la expresión de COX-2 y renina. Posteriormente en etapas más tardías de la hipertensión los niveles de expresión de estas enzimas presentan un patrón más complejo. El tratamiento durante dos semanas con celecoxib no afectó la presión arterial, mientras que el captopril, previno el aumento en la presión sanguínea en las SHR y, estimuló la expresión de renina y COX-2 en las WKY y de renina en las SHR. La proteína inmunorreativa para renina y COX-2 aumentó en corteza de las SHR por efecto del tratamiento con captopril, también aumentó el número de túbulos renales positivos a COX-2, que podrían estar contribuyendo a la regulación de la presión arterial a través del control del volumen. Los resultados obtenidos indican que la expresión de COX-2 y renina en corteza renal se regula de manera independiente en la hipertensión arterial primaria en la rata.

4. ABSTRACT.

Cyclooxygenase (COX) is an enzyme, primarily responsible for the regulation of the renal and cardiovascular systems through the formation of prostanoids, and through its influence on the Renin-Angiotensin System (RAS), which plays a crucial role in controlling systemic blood pressure. It has been shown that the COX-2 enzyme, as expressed in the *macula densa*, can modulate the release of juxtaglomerular renin, and there is also evidence of the regulation of the expression of COX-2 through multiple components of the RAS. However, there are also studies that suggest that under different conditions, the regulation of both enzymes occurs independently. This paper describes the steps that were carried out to determine the roles of COX-1, COX-2 and renin in the initial stages and throughout the development of primary hypertension, using the model of the genetic hypertension: the *spontaneously hypertensive rat (SHR)*. The purpose was to determine whether or not COX-2 or angiotensin II is involved in regulating the expression of renin and elevation of blood pressure. This was done through the use of Celecoxib, a COX-2 inhibitor, and the ACE inhibitor Captopril. Blood pressure and the expression of messenger RNA (mRNA) for COX-1, COX-2 and renin in the renal cortex were monitored, both in normotensive Wistar Kyoto rats (*WKY*), and in *spontaneously hypertensive rats (SHR)* in four age groups: 6 weeks, 8 weeks, 3 months and 5 months and thereafter to 6 weeks old pre-hypertensive rats, administered with Celecoxib (1mg/kg/day) and Captopril (30mg/kg/day) for two weeks. Also, the presence of COX-2 and renin was evaluated by determining percentage of protein positive glomeruli through the use of immunohistochemistry techniques. Blood pressure levels increased in the SHR's, starting at 8 weeks of age, whereas in the WKY's these remained normal throughout the experiment. Changes in the renal expression of mRNA for COX-1, COX-2 and renin were complex, since there was no indication of any relationship between the different enzymes, or of their interaction with blood pressure. The mRNA levels of COX-1, COX-2 and renin are dependent on age in WKY and SHR rats,

being higher in younger ages. At 6 weeks of age, when SHR's are still normotensive, a decreased expression of COX-2 and renin was observed. Subsequently at later stages of hypertension the expression levels of these enzymes have a more complex pattern. A two-week treatment with Celecoxib did not affect blood pressure, while Captopril prevented an increase in the blood pressure of the SHR's, and stimulated the expression of renin and COX-2 in the WKY's, and of renin in SHR's. As an effect of the treatment with Captopril, the immune reactive protein for renin and COX-2 increased in the cortex of the SHR's. Also, there was an increase in the number of COX-2 positive renal tubules, which might have been contributing to the regulation of blood pressure through the control of volume. The results obtained indicate that, in rats, the expressions of COX-2 and renin in the renal cortex are independently regulated in primary hypertension.

5. INTRODUCCIÓN.

5.1 Hipertensión arterial.

Los valores de presión arterial normales en el adulto humano están comprendidos entre 100-135 mmHg de presión arterial sistólica (PAS) y 65-89 mmHg de presión arterial diastólica (PAD), un aumento consistente del valor de PAS mayor a 140 mmHg y de PAD por arriba de 90 mmHg da lugar a la patología conocida como hipertensión arterial, que representa una de las causas más frecuentes de enfermedades cardiovasculares.

La presión arterial guarda una relación directa con el gasto cardiaco y con la resistencia periférica, en consecuencia, las variaciones de la presión arterial pueden ser causadas tanto por factores que interfieren con la función cardiaca, por los que regulan el volumen sanguíneo circulante, así como por procesos que actúan sobre tono vascular modificando las resistencias periféricas.

Los valores de la presión arterial sistémica se mantienen relativamente constantes en el tiempo, por un complejo conjunto de mecanismos nerviosos y humorales que actúan en el corazón, en el volumen hemático y en los vasos sanguíneos (Conti, 2010).

Los mecanismos de regulación, son descritos en términos de rapidez y duración de la acción reguladora, por lo que se distingue una regulación a corto plazo y a largo plazo.

La regulación a corto plazo (minutos-horas) se integra en forma prevalente por los reflejos que se inician en los receptores de presión (barorreceptores), que activan respuestas simpáticas y parasimpáticas que modulan tanto las resistencias periféricas, como la actividad cardiaca (Guyton, 2011).

La regulación a largo plazo (días o semanas) de la presión arterial depende de manera predominante de mecanismos sensibles que controlan el volumen sanguíneo y por lo general del

volumen de los líquidos extracelulares. Por lo tanto, estos mecanismos están en gran medida enlazados a la función renal, aunque algunos de estos dependen o actúan también sobre otras estructuras e influyen en la resistencia vascular periférica (Guyton, 2011).

En general se diferencian dos tipos de hipertensión, la hipertensión primaria o esencial y la hipertensión secundaria (Conti, 2010).

La hipertensión primaria tiene un origen desconocido y es muy frecuente, casi 90% de los sujetos sufre este tipo de hipertensión y numerosos factores son importantes para su desarrollo por ejemplo, la herencia genética, la dieta, el estilo de vida y la edad (Vikrant y Tiwari, 2001).

La hipertensión secundaria por otro lado tiene un origen conocido y puede ser consecuencia de alteraciones endocrinas, defectos enzimáticos suprarrenales, problemas vasculares u otros trastornos renales.

5.2 Sistema renal.

5.2.1 Estructura y función.

El sistema urinario renal es un conjunto de órganos compuestos fundamentalmente de dos partes: los riñones u órganos secretores productores de la orina y los órganos excretores compuestos por los uréteres, la vejiga urinaria y la uretra que se encargan de recoger la orina y expulsarla al exterior, extrayendo de ese modo productos de desecho del metabolismo celular y eliminándolos hacia el exterior del cuerpo.

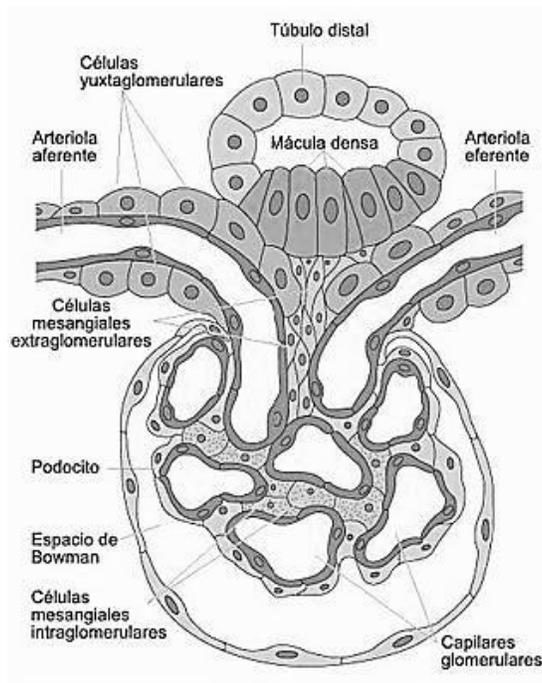
El riñón humano es un órgano complejo que desempeña funciones vitales; además de filtrar los productos residuales de la sangre y producir orina, interviene en el mantenimiento de la homeostasia por diferentes mecanismos como regular la concentración de iones y el volumen

sanguíneo, también interviene en la regulación de la presión arterial, la presión osmótica y el equilibrio acido-básico.

Los riñones se sitúan a ambos lados de la columna vertebral en la parte inferior de la espalda y constan de tres capas: la corteza (capa exterior), la médula y la pelvis renal; la sangre fluye a estos sitios a través de la arteria renal, que se ramifica en arterias cada vez más pequeñas, cada una de las cuales termina en una unidad de filtración sanguínea denominada nefrona. Un riñón humano sano contiene 1.3 millones de nefronas, estratégicamente situadas dentro de la corteza y la médula.

Una nefrona está formada por el glomérulo y los túbulos renales individuales. Los glomérulos que miden unos 200 μm de diámetro se forman por la invaginación de un mechón de capilares hacia el extremo ciego dilatado de la nefrona y están rodeados por la cápsula de Bowman. Los capilares están alimentados por una arteriola aferente y drenan por una arteriola eferente un poco más pequeña (Esquema 1).

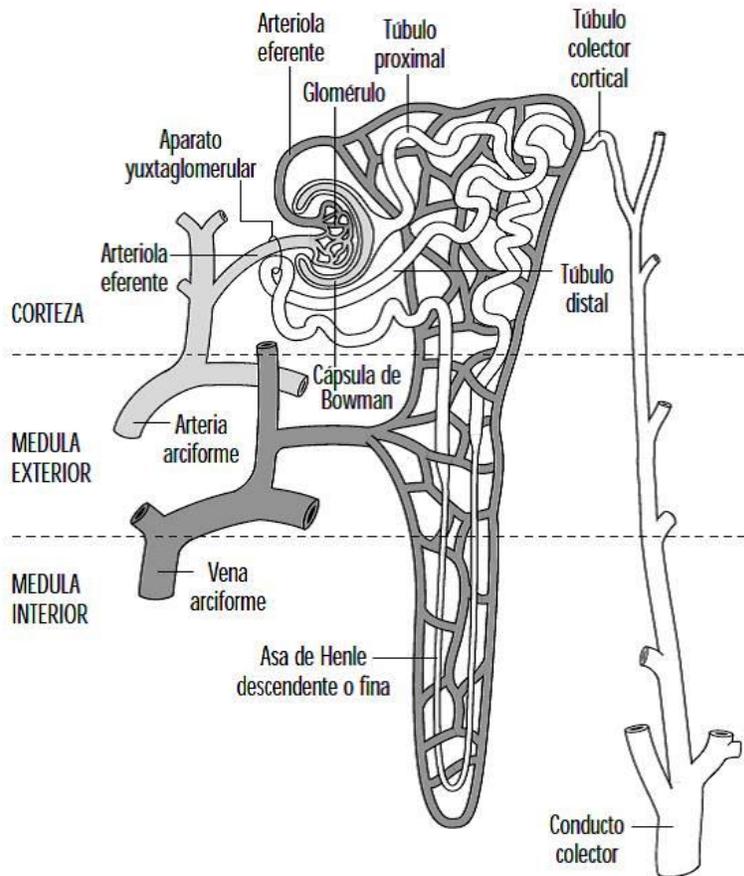
Hay dos capas celulares que separan la sangre del filtrado glomerular en la cápsula de Bowman: el endotelio capilar y el endotelio especializado de la cápsula, formado por los podocitos que cubren los capilares glomerulares. Estas capas están separadas por una lámina basal. Existen células estrelladas llamadas células mesangiales que se localizan entre la lámina basal y el endotelio, son contráctiles y participan en la regulación de la filtración glomerular, también secretan varias sustancias, captan complejos inmunitarios y participan en el desarrollo de enfermedades glomerulares (Guyton, 2011).



Esquema 1. Detalles estructurales del glomérulo. Corte a través del polo vascular, se muestran las asas capilares y el aparato yuxtglomerular (Tomado de Guyton, 2011).

La estructura de la membrana glomerular determina la selectividad de las sustancias que son filtradas, la carga negativa de la membrana basal permite el paso libre de sustancias neutras o con carga positiva como los iones, mientras los poros formados por el endotelio fenestrado, la red de colágena de la membrana basal y los podocitos, admiten únicamente el paso de moléculas con un tamaño menor a 8 nm, por lo que proteínas de mayor tamaño como la albúmina no se encuentran en el filtrado glomerular de individuos sanos (Guyton, 2011).

El túbulo renal de cada nefrona consta de los siguientes segmentos: el túbulo contorneado proximal que inicia en el espacio de Bowman, continua el asa de Henle con su porción descendente delgada, porción ascendente delgada y porción ascendente gruesa, posteriormente se diferencia el túbulo contorneado distal y este desemboca en el túbulo colector (Esquema 2). Cada segmento de la nefrona es funcionalmente distinto y las células epiteliales que revisten cada segmento tienen una estructura diferente de acuerdo a su función (Costanzo, 2011).



Esquema 2. Diagrama de una nefrona yuxtamedular. Se muestran los principales componentes de la nefrona y la circulación renal (Tomado de Hemstreet, 2001).

El riñón se conecta al sistema nervioso a través de los nervios renales. Los nervios contienen muchas fibras eferentes simpáticas y unas cuantas fibras aferentes. La innervación preganglionar simpática proviene casi completamente de los segmentos torácicos inferiores y lumbares superiores de la médula espinal. Los cuerpos celulares de las neuronas posganglionares se ubican en la cadena ganglionar simpática, en el ganglio mesentérico superior y a lo largo de la arteria renal.

Las fibras simpáticas se distribuyen principalmente en las arteriolas aferentes y eferentes, en los túbulos proximales y distales y en las células yuxtaglomerulares. Además, hay una densa

inervación noradrenérgica en el segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle (Guyton, 2011).

5.3 Sistema renina-angiotensina.

El sistema renina-angiotensina (RAS, por sus siglas en Inglés) interviene en el balance de sodio, el volumen del fluido extracelular y las resistencias vasculares renal y sistémica, de ese modo el RAS funciona como uno de los reguladores más importantes de la presión sanguínea sistémica y renal, por lo que participa de manera importante en la fisiopatología de la hipertensión, la insuficiencia cardiaca congestiva, el infarto del miocardio y la nefropatía diabética (Kobori y cols., 2007).

En general, la renina cataliza la conversión de su sustrato el angiotensinógeno, para liberar un péptido de 10 aminoácidos: la angiotensina I (Ang I) que tiene un efecto vasoconstrictor leve. Posteriormente, por hidrólisis se cortan dos aminoácidos más de esta molécula, para formar el péptido de 8 aminoácidos, la angiotensina II (Ang II). Esta conversión se produce casi totalmente en los pulmones, catalizada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente en el endotelio de los vasos pulmonares (Fig. 3).

La Ang II es una sustancia vasoconstrictora muy potente, que puede elevar la presión arterial mediante dos acciones principales. La primera ocurre al aumentar la resistencia vascular periférica total por la constricción intensa de las arteriolas y constricción leve de las venas, que favorecen el incremento del retorno de sangre venosa hacia el corazón, con lo que se facilita la función de bomba cardiaca contra el aumento de la presión. La segunda, al estimular la secreción de la hormona esteroide: aldosterona por las glándulas suprarrenales, dicha hormona promueve la disminución de la excreción de sal y de agua por los riñones, lo que aumenta lentamente el volumen de líquido extracelular y la presión arterial durante las horas y días sucesivos (Fleming y cols., 2006).

5.3.1 Componentes del sistema renina-angiotensina.

5.3.1.1 Renina.

La renina es una enzima que se sintetiza, se almacena en gránulos y se secreta por exocitosis a de las células yuxtglomerulares de las arteriolas aferentes hacia el espacio intravascular y el intersticio que lo rodea. La secreción de renina se regula positivamente por el segundo mensajero AMP cíclico; sin embargo, a diferencia de la mayoría de las células secretoras, la secreción de renina de las células yuxtglomerulares está inversamente relacionada a las concentraciones intracelulares y extracelulares de calcio (Beierwaltes, 2010).

La renina es una glucoproteína de 340 aminoácidos, se sintetiza como preproenzima de 406 aminoácidos que se procesan en prorenina, una forma madura pero inactiva de la enzima. A continuación se activa la prorenina al eliminar 43 aminoácidos de su aminoterminal para producir renina activa.

La renina es una proteasa de aspartilo que ataca un número restringido de sustratos, el principal es el angiotensinógeno; de manera similar a otras proteasas de aspartilo, la renina tiene una estructura bilobular con una hendidura que forma el sitio activo.

Existen diferentes mecanismos que regulan la liberación de renina: cambios en el flujo sanguíneo renal, los barorreceptores intrarrenales de la arteriola aferente, alteraciones en la captación de NaCl por la *mácula densa* y la influencia del sistema simpático sobre las arteriolas del aparato yuxtglomerular (Jackson, 2012).

Las células yuxtglomerulares de la arteriola aferente actúan como barorreceptores de presión alta: los incrementos o decrementos de la presión arterial bloquean o estimulan la liberación de renina, respectivamente. Las variaciones de la presión también pueden inhibir o estimular, la

liberación de prostaglandinas renales, que puede intervenir en la vía del barorreceptor intrarrenal para regular de la liberación de renina.

Otro mecanismo intrarrenal que controla la liberación de renina se denomina vía de la *mácula densa*, en este mecanismo un cambio de la absorción de NaCl por la *mácula densa*, modifica la secreción de renina por las células yuxtaglomerulares. El incremento de la llegada de NaCl a la *mácula densa*, inhibe la liberación de renina y la disminución la estimula. Tanto la adenosina como las prostaglandinas regulan la vía de la *mácula densa*; la adenosina se libera cuando aumenta el transporte de NaCl y al actuar vía del receptor A1 de Adenosina, inhibe la liberación de renina; mientras que las prostaglandinas se liberan al disminuir transporte de NaCl para estimular la liberación de renina.

La señalización primaria para estimular la secreción de renina por la vía de la *mácula densa* es la regulación al alza de la expresión de COX-2 que incrementa la producción de PGE₂ y PGI₂ y la activación de sus receptores EP₄ e IP, con lo que se estimula la adenilato ciclasa y el AMPc intracelular. La liberación de renina inducida por una dieta baja en sodio se amortigua por inhibición selectiva de COX-2 y se atenúa en el ratón con delección del gen para la COX-2 (Cheng y cols., 2001; Harris y cols., 2004).

Si bien el cambio en el transporte de NaCl es el fenómeno clave que regula la vía de la *mácula densa*, su regulación depende más de la concentración luminal de Cl⁻ que del Na⁺. El transporte de NaCl hacia la *mácula densa* está mediado por el cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻, y las concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) de Na⁺ y Cl⁻ necesarias para el transporte por medio de este simportador son de 2 a 3 y de 40 meq/L, respectivamente (Jackson, 2012).

El tercer mecanismo, denominado vía del receptor beta-adrenérgico, es mediado por la liberación de noradrenalina de los nervios simpáticos posganglionares, debido a que la activación de los receptores β_1 sobre las células yuxtaglomerulares aumenta la secreción de renina (Jackson, 2012).

Las vías que regulan la liberación de renina forman parte de una red fisiológica. Los incrementos de la secreción de renina aumentan la formación de Ang II, misma que estimula a los receptores de angiotensina de tipo 1 (AT_1) en las células yuxtaglomerulares para inhibir a liberación de renina. Este sistema de retroalimentación se conoce como mecanismo de retroalimentación negativa de asa corta.

La Ang II también incrementa la presión arterial por medio de la estimulación de los receptores AT_1 , y los aumentos de la presión arterial bloquean la liberación de renina por: 1) la activación de barorreceptores de presión alta, lo cual reduce el tono simpático renal, 2) incremento del tono de los vasos preglomerulares, y 3) la reducción de la reabsorción de NaCl en los túbulos proximales (natriuresis por presión), que aumenta la liberación tubular de NaCl hacia la *mácula densa*. La inhibición de la liberación de renina debido a incrementos de la presión arterial inducidos por Ang II es el mecanismo de retroalimentación negativa de asa larga.

Diferentes factores pueden influir las vías fisiológicas que regulan la liberación de renina, como la presión arterial, el consumo dietético de sal y varios fármacos (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

5.3.1.2 Angiotensinógeno.

El angiotensinógeno es el sustrato principal de la renina, es una glucoproteína globular abundante que contiene de 13 a 14% de carbohidratos. Al segmentar la región aminoterminal del angiotensinógeno, se obtiene la angiotensina I. En el humano el angiotensinógeno tiene 452

aminoácidos y se sintetiza como preangiotensinógeno, que tiene un péptido señal de 24 a 33 aminoácidos.

El angiotensinógeno se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también abundan transcritos de angiotensinógeno en los adipocitos, en ciertas regiones del SNC y en los riñones. El angiotensinógeno se sintetiza y secreta de manera continua en el hígado y su síntesis se estimula por inflamación, insulina, estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea y Ang II (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

5.3.1.3 Enzima convertidora de angiotensina.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una ectoenzima y una glucoproteína, con un peso molecular de 170 000 daltones, en los seres humanos contiene 1277 aminoácidos y posee dos dominios homólogos, cada uno con un sitio catalítico y una región para unirse al zinc. Posee un gran dominio extracelular amino terminal, un dominio intracelular carboxilo terminal corto, y una zona hidrófoba de 17 aminoácidos que fija a la ectoenzima en la membrana celular.

La ECA circulante representa la enzima de la membrana que se liberó por proteólisis vía una secretasa y se ha desprendido. La enzima es inespecífica e hidroliza unidades de sustratos con diversas secuencias de aminoácidos, los sustratos preferidos solo tienen un grupo carboxilo libre en el carboxilo terminal y la prolina no debe ser el penúltimo aminoácido; por lo que la Ang II no es sustrato de la ECA.

Si bien en el plasma ocurre la conversión lenta de angiotensina I en Ang II, el metabolismo muy rápido que ocurre *in vivo* se debe en gran parte a la actividad de la ECA unida a la membrana, presente en la cara luminal de células endoteliales de todo el sistema vascular (Jackson, 2012).

Dos grupos de estudio descubrieron de manera independiente una nueva carboxipeptidasa relacionada con la ECA, que se denomina ECA2. La ECA2 del ser humano tiene 805 aminoácidos con una posible secuencia señal corta. Contiene un dominio catalítico aislado que es 42% idéntico a los dos dominios catalíticos de la ECA. La ECA2 segmenta la angiotensina I en angiotensina (1-9), y procesa la Ang II en la angiotensina (1-7). En animales, se observa que una expresión reducida de ECA2 se acompaña de hipertensión y defectos en la contractilidad cardiaca (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

5.3.1.4 Péptidos de angiotensina.

Existen otros péptidos de angiotensina además de la angiotensina I y II, con efectos fisiológicos. La angiotensina III también denominada angiotensina (2-8), puede formarse por efecto de la aminopeptidasa sobre la Ang II o por el de la ECA sobre la [des-Asp¹] angiotensina I. Las angiotensinas II y III causan efectos cualitativamente similares, la angiotensina III es casi igual de potente que la II en la estimulación de la secreción de aldosterona; sin embargo, solo tiene 10 y 25% de la potencia de la II para aumentar la presión arterial y estimular la médula suprarrenal, respectivamente (Fleming y cols., 2006).

La angiotensina (1-7) libera vasopresina, estimula la biosíntesis de prostanglandinas, produce respuestas depresoras cuando se inyecta en ciertos núcleos del tallo encefálico, dilata algunos vasos sanguíneos y ejerce una acción natriurética en los riñones. La angiotensina (1-7) también inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular y se ha propuesto que la angiotensina (1-7) sirve para contrarrestar o equilibrar las acciones de la Ang II (Ferrario y cols., 1997).

La angiotensina (3-8), también denominada angiotensina IV, es otro péptido de angiotensina activo biológicamente. En varios tejidos se detectan posibles receptores de angiotensina (3-8), y el péptido estimula la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno I en células endoteliales

y tubulares proximales, aunque en las células del músculo liso vascular y en los cardiomiocitos es la Ang II la que interviene en el aumento de la expresión de los inhibidores del activador de plasminógeno I. La angiotensina (3-8) también puede participar en la adquisición de la memoria e igual que la angiotensina (1-7), al parecer contrarresta los efectos de la Ang II (Jackson, 2012).

La angiotensina (1-7) se forma por múltiples vías: al metabolizarse la angiotensina I por la metalopeptidasa 24.15, la endopeptidasa 24.11 y la prolilendopeptidasa 24.26, también se puede formar a partir de la conversión de la Ang II por la prolilcarboxipeptidasa (Ferrario y cols., 1997).

La ACE2 convierte la angiotensina I en angiotensina (1-9) y la Ang II en angiotensina (1-7); la ECA metaboliza la angiotensina (1-9) en angiotensina (1-7). Los inhibidores de la ECA aumentan las concentraciones hícticas y plasmáticas de angiotensina (1-7) porque incrementan las concentraciones de angiotensina I y se derivan de la formación de Ang II y porque la ECA contribuye de manera importante a la depuración de angiotensina (1-7) del plasma (Jackson, 2012; Fleming y cols., 2006).

5.3.1.5 Receptores de Ang II.

Los efectos de la Ang II se ejercen a través de receptores hepta helicoidales específicos acoplados a proteínas G. Los dos receptores de Ang II son los receptores AT₁ y AT₂.

El receptor AT₁ tiene 359 aminoácidos y el receptor AT₂ tiene 363 aminoácidos. Los receptores AT₁ y AT₂ tienen poca homología de secuencia. Casi todos los efectos biológicos conocidos de la Ang II son mediados por el receptor AT₁, aún no se definen bien las actividades funcionales de los receptores AT₂, pero es posible que ejerzan efectos antiproliferativo, proapoptótico, vasodilatador y antihipertensor (de Gasparo y cols., 2000).

Es posible que los efectos complejos de la activación del receptor AT₂ en el tono y la biología vasculares dependan de factores como especie, órgano y diámetro vascular. Aunque al receptor AT₂ se le conceptualiza como protector cardiovascular, su activación puede contribuir a la fibrosis cardíaca. El receptor AT₂ está ampliamente distribuido en tejidos fetales, pero tal distribución es muy limitada en los adultos, en los que algunos tejidos contienen receptores AT₁ o AT₂ en tanto que otros contienen receptores en cantidades semejantes (Siragy, 2000).

Los receptores AT₁ activan diferentes sistemas de transducción de señales para producir efectos que varían con el tipo de célula y que son una combinación de respuestas primarias y secundarias, se acoplan a varias proteínas G heterotriméricas, incluyendo G $\alpha_{q/11}$, G $\alpha_{12/13}$ y G_i aunque en casi todos los tipos de células, los receptores AT₁ se acoplan a G $\alpha_{q/11}$ para activar fosfolipasas como la A, la D y la C (PLC), esta última genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol que activa a la proteincinasa C (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Fleming y cols., 2006), que a su vez fosforila diferentes proteínas que participan en acciones como son la contracción del músculo liso y la secreción de aldosterona, así como el crecimiento y la proliferación celular.

5.3.2 Funciones del sistema renina-angiotensina.

El RAS tiene un lugar importante en la regulación de la presión arterial a corto y largo plazos, sus funciones principales son realizadas por los diferentes péptidos, incluyendo la Ang II.

Aumentos moderados de la concentración de Ang II en plasma aumentan de manera aguda la presión arterial, cuando se inyecta por vía intravenosa, con una dosis única moderada de Ang II la presión arterial sistémica empieza a aumentar en segundos, rápido alcanza un máximo y se normaliza en minutos. Esta respuesta presora rápida a la Ang II se debe al incremento rápido de la resistencia periférica total, respuesta que ayuda a conservar la presión arterial en una exposición aguda a hipotensión, como pérdida de sangre o vasodilatación.

La Ang II incrementa de manera directa la contractilidad cardiaca por medio de la apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje en miocitos cardiacos y de manera indirecta la frecuencia cardiaca al favorecer el tono simpático, la neurotransmisión adrenérgica y liberación de catecolaminas suprarrenales; el incremento rápido de la presión arterial activa un reflejo barorreceptor que disminuye el tono simpático y aumenta el tono vagal. Así la Ang II puede incrementar, disminuir o no cambiar la contractilidad, la frecuencia y el gasto cardiacos, dependiendo del estado fisiológico (Jackson, 2012).

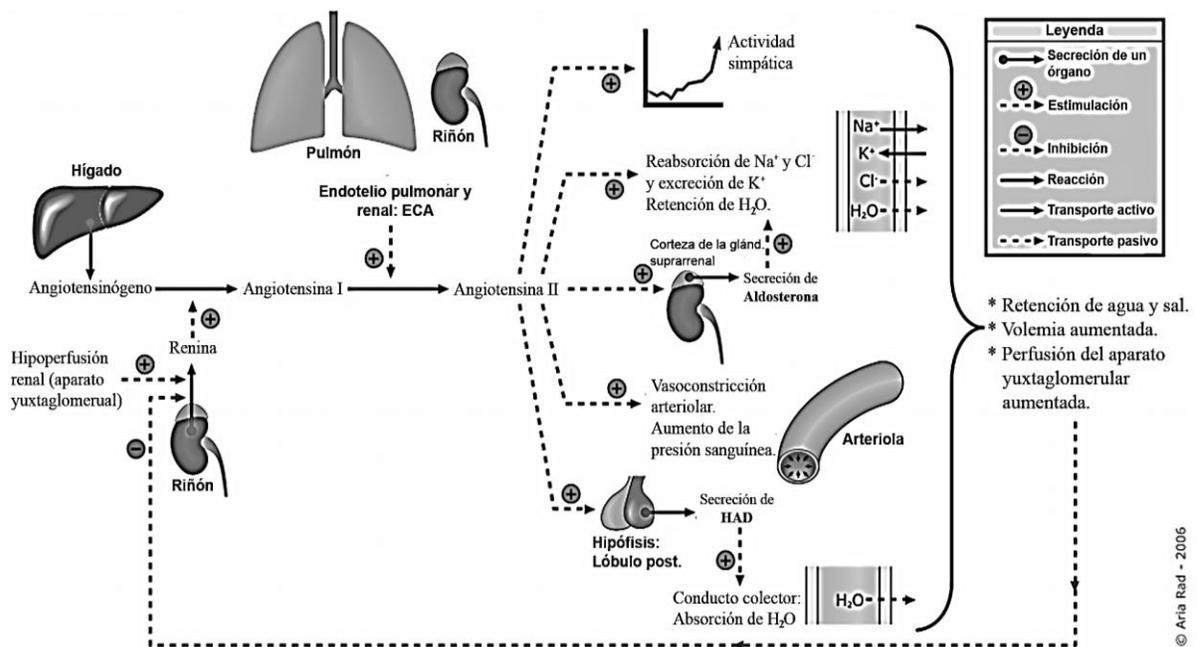
La Ang II también genera una respuesta presora lenta que ayuda a estabilizar la presión arterial a largo plazo. Un suministro continuo de dosis, inicialmente subpresoras de Ang II incrementa de manera gradual la presión arterial; se requieren días para que se alcance el efecto máximo. Esta respuesta presora lenta es mediada probablemente por disminución de la función renal excretora. La Ang II estimula la síntesis de endotelina I y anión superóxido que puede contribuir a la respuesta presora lenta (Kobori y cols., 2007).

Otros efectos ocasionados por la Ang II que contribuyen al aumento de la presión arterial son los siguientes: vasoconstricción de las arterias sistémicas y renales, que incrementan la resistencia periférica total y la presión sanguínea; por otro lado, la activación de los receptores de Ang II en el cerebro incrementan el flujo simpático hacia el corazón y la vasculatura, lo que incrementa el rendimiento cardiaco y la resistencia periférica total (Savoia y cols., 2011).

La Ang II también ocasiona la estimulación de la liberación de arginina-vasopresina desde la hipófisis anterior, que incrementa la retención de fluidos en el conducto colector renal para ayudar a conservar el volumen sanguíneo, estimula la sed para aumentar la ingesta de fluidos y el volumen sanguíneo. La Ang II plasmática incrementa la liberación de aldosterona de la corteza

adrenal, que incrementa el NaCl y la reabsorción de fluidos en la nefrona distal para incrementar el volumen del fluido extracelular (Guyton, 2011) (Esquema 3).

Además de sus efectos en la presión arterial, la Ang II altera significativamente la morfología del aparato cardiovascular, causa hipertrofia de células vasculares y cardíacas y aumenta la síntesis y depósito de colágena por fibroblastos cardíacos (Jackson, 2012).



Esquema 3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Esquema con los diferentes componentes del sistema así como sus funciones y mecanismos de regulación (Tomado de Kobori y cols., 2007).

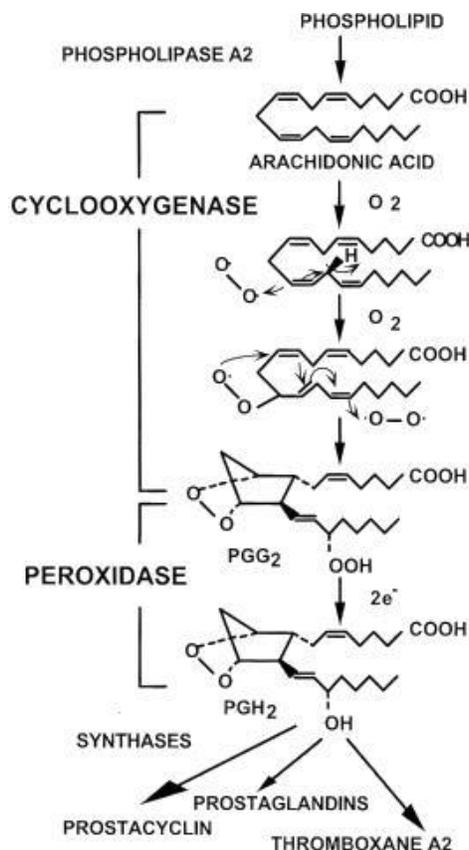
5.4 Ciclooxygenasa.

La ciclooxygenasa o prostanglandina endoperóxido sintasa es la enzima responsable de la regulación de los sistemas renal y cardiovascular vía la formación de los prostanoides.

Se han descrito dos isoformas de ciclooxigenasa, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), estas dos isoformas muestran 60% de homología, pero son productos de genes diferentes y tienen distintos patrones de expresión y regulación. La COX-1 es la isoforma constitutiva debido a su expresión generalizada en la mayoría de los tejidos, mientras que la COX-2 se considera la forma inducible debido a su expresión constitutiva restringida y su sobreexpresión por estímulos inflamatorios y proliferativos, así como por su papel central en la fisiopatología de procesos como la angiogénesis, inflamación y tumorigénesis, (Cheng y Harris, 2004). Sin embargo, recientemente la COX-1 también ha recibido atención como blanco terapéutico debido a su implicación en diferentes patologías como síndromes inflamatorios, aterosclerosis y algunos tipos de cáncer (Perrone y cols., 2010).

En el riñón la COX-1 es altamente expresada en los conductos colectores, en células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman, en células intersticiales, en células mesangiales glomerulares y células endoteliales de las arteriolas. La COX-2 se expresa predominantemente en las células intersticiales de la médula, en células de la *mácula densa*, en la porción ascendente gruesa del asa de Henle y, en el humano, también se ha observado en podocitos y en células de músculo liso arteriolar (Harris, 2006).

Las COXs catalizan una reacción ciclooxigenasa (bis-oxigenasa) en la que su sustrato, el ácido araquidónico se combina con dos moléculas de O_2 para convertirse en una molécula cíclica, la prostanglandina PGG_2 y una reacción de peroxidasa en la que se reducen dos electrones de la PGG_2 para convertirse en la prostanglandina H_2 (PGH_2). Estas dos reacciones ocurren en sitios distintos pero interconectados, estructural y funcionalmente, en la enzima (Smith y cols., 2000) (Esquema. 4).



Esquema 4. Mecanismo de síntesis de prostaglandinas. Se observan las reacciones enzimáticas catalizadas por las ciclooxigenasas 1 y 2 sobre su sustrato el ácido araquidónico (Tomado de Smith y cols., 2000).

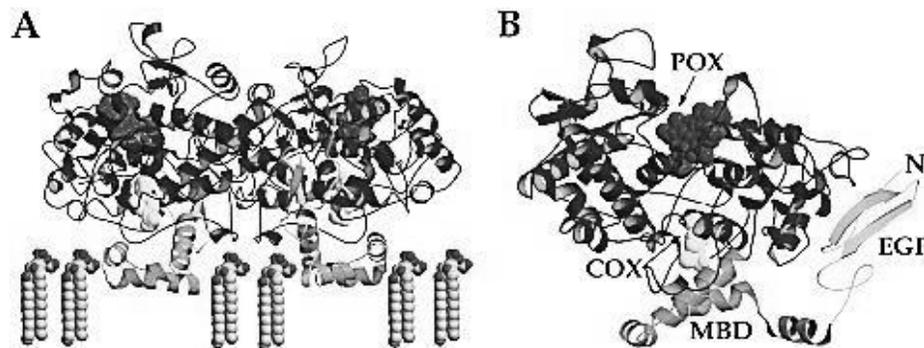
3.4.1 Estructura de la ciclooxigenasa.

Ambas isoformas contienen péptidos señal de longitud variable, la COX-1 madura contiene 576 aminoácidos, mientras que la COX-2 contiene 587 aminoácidos, hay un 60% -65% de homología entre ambas secuencias de aminoácidos en COX de la misma especie, y 85% -90% de homología entre la misma isoforma de diferentes especies (Smith y cols., 2000).

Las isoformas COX son homodímeros funcional y estructuralmente, aunque se desconoce porque es necesaria la dimerización para la catálisis. Hay estudios que sugieren que cuando se coexpresan

ambas isoformas en la misma célula, pueden formar heterodímeros funcionales donde COX-2 facilita la biosíntesis de prostanoídes por COX-1 (Yu y cols., 2006; Smith y cols., 2000).

Cada monómero de COX se compone de tres dominios estructurales: un dominio de 50 aminoácidos en el extremo N-terminal similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF), un dominio de unión a membrana (MBD) de 50 aminoácidos y un gran dominio globular carboxilo-terminal catalítico de 460 aminoácidos (Smith y cols., 2000) (Esquema 5).



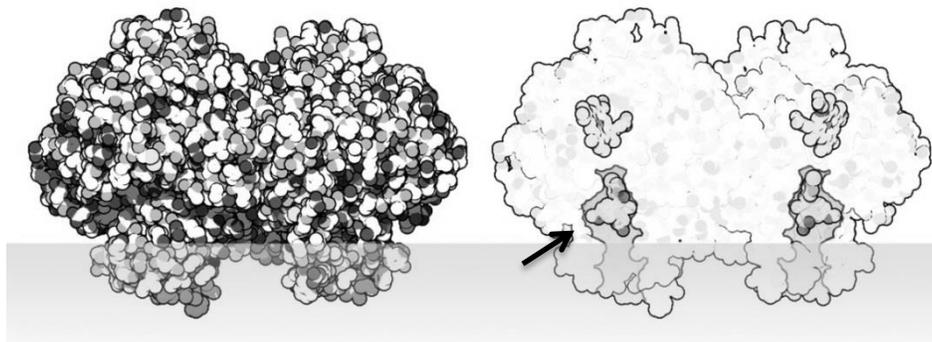
Esquema 5. Estructura cristalizada de la COX. (A) Se observa el diagrama en cinta del homodímero de la especie ovina de COX-1 asociada a una de las caras de la superficie luminal de la bicapa lipídica. (B) Se observa el diagrama en cinta de un monómero de COX donde se indica la localización de los sitios activos peroxidasa (POX), ciclooxigenasa (COX), dominio de unión a membrana (MBD) y el dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Tomado de Smith y cols., 2000).

El MBD de COXs contiene 4 hélices α anfipáticas, cortas y consecutivas, la hélice D se funde en el dominio catalítico. Los residuos hidrofóbicos y aromáticos sobresalen de estas hélices lejos de la superficie hidrofílica del dominio catalítico, para crear un parche hidrofóbico que interactúa con una de las capas de la bicapa lipídica. Estas hélices también rodean una abertura por la que se cree que los sustratos ácidos grasos, y los fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroídes entran en el sitio activo ciclooxigenasa (Jahnke, 1990).

Ambas isoformas de COX son monotópicas y están presentes en la superficie luminal del retículo endoplásmico y de las membranas interior y exterior de la membrana nuclear; la COX-1 y COX-2

contienen secuencias Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) en el C-terminal que las dirigen hacia estos sitios. La COX-2 parece estar más concentrada dentro de la envoltura nuclear, sugiriendo que los productos que forma pueden tener un mayor acceso al nucleoplasma, y de este modo afectar eventos nucleares, posiblemente a través de receptores nucleares (Garavito y Mulichnak, 2003).

La COX-1 esta N-glicosilada en 3 sitios, mientras que la COX-2 está glicosilada de 2-4 sitios, la glicosilación de ambas enzimas es por la unión de oligosacáridos ricos en manosa, uno de los cuales facilita el plegamiento de la enzima, el cuarto oligosacárido presente en COX-2 regula su degradación. Las estructura de las COXs contienen varios canales de agua, incluyendo un canal ramificado, que se extiende desde el sitio ciclooxygenasa, cerca Gly533 a la interface del dímero (Esquema 6). No está claro si los canales de agua son simplemente estructurales o juegan algún papel directo en la catálisis (Jahnke, 1990).



Esquema 6. Ubicación del sitio activo de la ciclooxigenasa. Se observa la ubicación del sitio activo en el homodímero de la ciclooxigenasa con su sustrato unido al canal hidrofóbico (flecha) y sombreada la región de unión a la membrana (tomado de Goodsell DS., 2000).

La principal diferencia en la secuencia de las COX ocurre en los dominios de unión a membrana, también hay 18 aminoácidos insertados a 6 residuos del dominio C-terminal de COX-2 que no están presentes en COX-1, la función de este inserto no se conoce, pero puede estar marcando a COX-2 para sufrir proteólisis rápida o proporcionar una señal de tráfico subcelular, la eliminación

de esta secuencia por mutagénesis de eliminación no tiene ningún efecto aparente sobre la catálisis de COX-2 (Picot y Garavito, 1994).

La reacción ciclooxigenasa ocurre en un canal hidrofóbico en el núcleo de la enzima, mientras que la reacción peroxidasa se produce en un sitio activo que contiene un grupo hemo situado cerca de la superficie de la proteína. *In vitro*, la actividad de la peroxidasa puede operar independientemente de la actividad ciclooxigenasa, cuando este sitio está ocupado por fármacos o durante el curso de la catálisis ciclooxigenasa. Sin embargo, la reacción ciclooxigenasa es dependiente de peróxido y requiere que el grupo hemo en el sitio de peroxidasa sufra una oxidación de dos electrones (Marnett y cols., 1999).

5.4.1.1 Estructura del sitio activo ciclooxigenasa.

La estructura del sitio activo en la COX-1 y en la COX-2 es muy similar; sin embargo, hay dos diferencias estructurales entre las isoformas que tienen importantes consecuencias farmacológicas y biológicas. En primer lugar, el sitio activo ciclooxigenasa de COX-2 es más grande y favorecedor para la catálisis que el de COX-1. Esta diferencia de tamaño se ha explotado en el desarrollo de fármacos bloqueadores específicos de COX-2. En segundo lugar, aunque las propiedades cinéticas (por ejemplo, K_m , V_{max}) de COX-1 y 2 son casi idénticas, COX-1 presenta alosterismo negativo a bajas concentraciones de ácido araquidónico, esta diferencia puede permitir a COX-2 competir más eficazmente por el ácido araquidónico recién liberado cuando las dos isoformas se expresan en la misma célula (Smith y cols., 2000; Simmons y cols., 2004).

Los monómeros de COX-1 y 2 contienen cada uno un canal hidrofóbico de 25 Å que se origina en el dominio de unión a membranas (MBD) y se extiende hasta el núcleo del dominio globular. El MBD forma la boca y la primera mitad del canal y permite al ácido araquidónico y al O_2 entrar directamente desde el compartimiento apolar de la bicapa lipídica. El sitio de unión con fármacos

analgésicos antiinflamatorios no esteroideos consiste en la mitad superior de este canal desde Arg120 a cerca de Tyr385 (Marnett y cols., 1999).

El sitio activo ciclooxygenasa de la COX-2 es un 20% más grande y tiene una forma ligeramente diferente a la de COX-1, esta diferencia, se debe al cambio de 3 aminoácidos: Ile523 a Val523 en la primera capa del sitio activo, Ile 434 a Val434 e His513 a Arg513 en la segunda capa (Garavito y Mulichak, 2003).

La otra diferencia estructural importante es la posición de la hélice D, la última de las cuatro hélices del MBD. En COX-2 este segmento helicoidal sobresale hacia arriba, fuera de la estructura, para proporcionar una abertura más grande en el MBD, y como consecuencia, Arg120 es desplazada, estas diferencias influyen en la unión del inhibidor y proporcionan una mayor flexibilidad del sustrato en el sitio ciclooxygenasa de COX-2 (Garavito y Mulichak, 2003).

5.4.1.2 Estructura del sitio activo peroxidasa.

El sitio activo peroxidasa se une a PGG₂, el grupo hidroperóxido de esta molécula interactúan con el hierro, su grupo carboxilo cargado negativamente es rodeado por residuos polares, con tres cargas básicas una de las cuales no se compensa, lo que le permite interactuar. La porción no polar de PGG₂ está en un canal hidrofóbico formado por valinas y leucinas con Phe409 cerca del final de ω PGG₂. His388 es el ligando del hemo proximal, un nitrógeno de imidazol une el hierro férrico y el otro nitrógeno e hidrógeno del imidazol une Tyr504 a través de una molécula de agua. Se cree que la histidina distal His207 es importante en la desprotonación del sustrato hidroperóxido y la protonación posterior del ion alcóxido para formar el alcohol durante la generación del compuesto I intermediario. Gln203 también es importante en la catálisis, aunque no se conoce su función. Las mutaciones de Gln203, His207 o His388 conducen a una reducción o eliminación de la actividad peroxidasa (Garavito y Mulichak, 2003; Simmons y cols., 2004).

5.4.2 Regulación de la expresión de la ciclooxigenasa.

COX-1 se considera como un gen constitutivo por su expresión constante en la mayoría de los tipos celulares y tejidos, aunque en niveles bajos, a excepción del estómago y las plaquetas donde se expresan niveles constitutivos elevados.

La expresión de COX-2 es inducible en su mayoría, aunque también se expresa de manera constitutiva en algunos tipos celulares.

En el riñón la expresión de la COX-2 se regula diferencialmente en la corteza y en la médula; la restricción de sodio aumenta la expresión en la corteza y disminuye la expresión en la médula, mientras que el incremento en el consumo de sal aumenta la expresión de la COX-2 de la médula interna, pero disminuye la expresión de la corteza. Esta expresión diferencial refleja las funciones distintas de los prostanoïdes derivados de COX-2, contribuyendo en la médula a la reabsorción de sal y agua, así como a la regulación del flujo sanguíneo medular; mientras que en la corteza interviene en la liberación de renina y la hemodinámica glomerular (Yang y cols., 1998).

La sobreexpresión de COX-2 parece ser consecuencia del incremento en la transcripción y aumento en la estabilidad del RNAm. Promotores de tumores, factores de crecimiento, oncogenes y citocinas estimulan la transcripción del gen de COX-2 de manera dependiente de PKC y Ras (Simmons y cols., 2004).

La región promotora del gen de COX-2 contiene una caja TATA y varios posibles elementos de regulación transcripcional, como NF- κ B, NF-IL6/C/EBP, PEA3, NFAT, CRE, AP-2 y SP-1; dependiendo del estímulo y del tipo celular, esos factores de transcripción estimulan la expresión de COX-2 (Chun y Surh., 2004; Simmons y cols., 2004; Tsatsanis y cols., 2006).

El factor nuclear κB (NF- κB , por sus siglas en Inglés) es un factor de transcripción inducible, responsable de regular la expresión de genes implicados en la supervivencia celular, adhesión celular, inflamación, diferenciación y crecimiento, entre otros. La región promotora de COX-2 contiene dos posibles sitios de unión para NF- κB , y se ha demostrado que este factor de transcripción es un posible regulador de la expresión de COX-2 en macrófagos murinos y en líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano expuestos a lipopolisacáridos. Varios agentes que activan las MAPKs también activan NF- κB lo que sugiere la interconexión entre estas vías y se propone a la MAPK, ERK una cinasa corriente arriba de JNKs, así como la MAPK p38 son las principales reguladoras de su activación. (Chun y Surh, 2004; Chen y cols., 2004; Wu, 2005)

Los factores de transcripción C/EBP también están implicados en regular la actividad del promotor de COX-2. Hay un sitio de unión para C/EBP sobre el promotor del gen de COX-2 humano, en las posiciones 132/124 corriente abajo de un sitio adyacente a AP-2 que tiene un papel en la inducción de COX-2 por lipopolisacáridos y 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate o TPA (Inoue y cols., 1995; Wu, 2005).

El elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE, por sus siglas en Inglés) también se ha implicado en la inducción de COX-2 por bradicinina, en células de músculo liso arteriolar de pulmón (Bradbury, 2003); otro posible mecanismo para modular la expresión de COX-2 implica a los receptores activados por peroxisomas (PPAR, por sus siglas en Inglés), la activación de PPAR δ resultó en el incremento del RNAm de COX-2 y la expresión de su proteína en carcinoma hepatocelular humano, y los activadores de PPAR α también inducen la expresión de COX-2 en hígado de rata. La regulación de la expresión de COX-2 por PPARs es compleja y parece ser específico del tipo celular (Chun y Surh, 2004; Tsatsanis y cols., 2006).

Uno de los principales genes supresores de tumores p53, implicado en la progresión del ciclo celular, la integridad del DNA y la supervivencia celular, parece también estar implicado en la regulación de la expresión de COX-2. Basado en estudios *in vitro*, p53 inhibió la unión de la proteína de unión a TATA con la región promotora del gen de COX-2, al competir con la proteína de unión a TATA (Subbaramaiah y cols., 1999).

5.4.3 Prostanoides derivados de ciclooxigenasa.

Los prostanoides son un grupo de reguladores lipídicos derivados del metabolismo enzimático del ácido araquidónico, iniciado por las COXs. Los prostanoides tienen funciones críticas al regular múltiples procesos celulares, como proliferación celular, diferenciación y apoptosis y en controlar la homeostasis del cuerpo; además tienen un papel importante en la fisiopatología de la inflamación, el cáncer y la hipertensión (Hao y Breyer, 2008).

Durante la síntesis de prostanoides, la ciclooxigenasa cataliza una reacción ciclooxigenasa (bisoxigenasa), en la que el ácido araquidónico se combina con dos moléculas de O₂ para convertirse en la molécula cíclica, la prostaglandina PGG₂, y una reacción de peroxidasa en la que se reducen dos electrones de la PGG₂ para convertirse en la prostaglandina H₂ (PGH₂). La PGH₂ es químicamente inestable, por lo que se transforma, por acción enzimática de sintasas específicas, en las prostaglandinas E₂ (PGE₂), D₂ (PGD₂), F_{2α} (PGF_{2α}), I₂ (PGI₂) y el tromboxano A (TXA₂) (Smyth y cols., 2012).

La PGH₂ es transformada por sintasas de prostanoides a diferentes productos distintos; las sintasas de prostanoides incluyen a la PGE sintasa (PGES), la prostaciclina sintasa (PGIS), la PGD sintasa (PGDS), la PGF sintasa (PGFS) y la tromboxano sintasa (TXAS) (Nasrallah y cols., 2007).

Los prostanoideos son rápidamente degradados, esto limita su efecto a la vecindad de su sitio de síntesis en funciones autocrinas o paracrinas. Cada prostanoides actúa sobre un receptor de membrana específico, acoplado a proteínas G o sobre receptores nucleares como PPAR δ y PPAR γ (Hao y Breyer, 2008).

La distribución de las sintasas de prostanoideos en el riñón está bien caracterizada. La presencia de la sintasa 1 microsomal de PGE (mPGE1) y COX-2 en la porción gruesa ascendente cortical de asa y en células intersticiales medulares sugiere que están funcionalmente acopladas y que esta sintasa contribuye a la biosíntesis de PGE₂ en estas células. Sin embargo en los ductos colectores la mPGES1 inducible parece estar acoplada a COX-1 contribuyendo al incremento en la biosíntesis de PGE₂ en estas células (Hao y Breyer, 2008).

La PGE₂ es el prostanoides más abundante detectado en el riñón, seguido por PGI₂, PGF_{2 α} y TxA₂; bajo condiciones basales COX-1 y COX-2 son responsables de la biosíntesis de prostanoideos, sin embargo en el riñón estimulado por Ang II la PGE₂ y la PGI₂ son producidos principalmente por acción de COX-2 (Qi y cols., 2006).

Los prostanoideos ejercen sus funciones a través de receptores específicos, que comprenden una familia diversa de receptores membranales de prostanoideos acoplados a proteínas G, estos incluyen los D-prostanoideos (DP), T-prostanoideos (TP), F-prostanoideos (FP), I-prostanoideos (IP) y E-prostanoideos (EP), de los cuales hay 4 subtipos EP; EP1, EP2, EP3 y EP4 (Hao y Breyer, 2008).

El receptor TP es un potente activador de la agregación plaquetaria y la constricción de músculo liso; mientras que el receptor IP tiene un potente efecto antitrombótico. Los receptores EP1 y EP3 son constrictores del músculo, mientras que los receptores EP2, EP4 e IP relajan el músculo liso, incluyendo la vasculatura (Smyth y cols., 2012).

Cada receptor de prostanooides activa una vía de señalización acoplada a una proteína G diferente. Los receptores IP, DP, EP2 y EP4 están acoplados a proteínas G estimuladora (G_s) y su señalización se relaciona con incremento de los niveles de AMPc; mientras el receptor TP, FP y EP1 inducen movimiento de calcio, al menos en algunos tejidos. El receptor EP3 está acoplado a una proteína G inhibitoria (G_i) y reduce la síntesis de AMPc. Aunque algunos de estos receptores siguen la misma vía de segundos mensajeros, los blancos corriente abajo de la vía pueden ser diferentes llevando a efectos fisiológicos diferentes (Hao y Breyer, 2008).

Los receptores EP2 y EP4 o el IP parecen participar en el control del flujo sanguíneo medular al dilatar la *vasa recta*, mientras que los receptores EP1 y EP3 parecen mediar la inhibición de la absorción de agua y sal en la porción gruesa del asa y en los túbulos colectores (Hao y Breyer, 2008; Smyth y cols., 2012).

5.4.4 Contribución de la COX a la patogénesis de la hipertensión.

La COX-1 y la COX-2 intervienen en la regulación de la presión arterial normal y en patologías como la hipertensión arterial, mediante la producción de prostanooides vasoconstrictores y vasodilatadores que regulan la función cardiovascular, y que participan en la regulación de la concentración de iones y del volumen de agua (Ye y cols., 2006). Se observó que la COX-1 y la COX-2 pueden tener diferentes efectos sobre la presión sanguínea dependiendo el tipo de protanoide al que se encuentren asociados, en este sentido, la inhibición de la COX-2 aumenta el efecto presor de la administración aguda de Ang II y el flujo sanguíneo medular renal en ratas anestesiadas, mientras que la inhibición de la COX-1 atenúa la hipertensión arterial en este modelo (Qi y cols., 2002).

Diversos estudios proponen, que la inhibición selectiva de COX-2 se asocia con hipertensión, por un mecanismo multifactorial. La inhibición de COX-2 parece alterar la natriuresis y promover la

retención de sodio, aunque el mecanismo no ha sido explicado completamente, el aumento de la expresión de COX-2 en la corteza se asocia con una disminución en la captura de NaCl de la dieta. A su vez se ha reportado que la dieta elevada en sodio aumento la expresión de la COX-2 en la medula renal, favoreciendo la hipertensión (Yao y cols., 2005; Ye y cols., 2006; Zewde y Mattson, 2004), en este sentido, la inhibición de la COX-2 eleva la presión sanguínea sistólica en ratas SHR y WKY con dieta alta en sales pero no en ratas con un bajo consumo de sales, sugiriendo que la hipertensión inducida por la inhibición de la COX-2 puede ocurrir independientemente de la predisposición genética a hipertensión y puede ser prevenida por la restricción de sal en la dieta (Hochehl, 2002).

Recientemente se ha estudiado más a fondo el papel de los prostanoïdes de manera particular, en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, como infarto agudo al miocardio, aterosclerosis y la misma hipertensión arterial (Yuhki y cols., 2011; Félétou y cols., 2011; Tang y Vahoutte, 2008). La PGE₂ contribuye a la regulación de la presión arterial a través de modular el flujo sanguíneo, la excreción de sodio y la reabsorción de agua, así como intervenir en la regulación del RAS (Swan y Breyer, 2011; Yang T, 2007; Jia y cols., 2006). EL TXA₂ es un potente vasoconstrictor y se observó que la delección del gen para este prostanoïde ocasiona la disminución del efecto presor ocasionado por Ang II, proponiendo que participa en su mecanismo de regulación (Francois y cols., 2004). La PGI₂ por otro lado es un potente vasodilatador producido por las células endoteliales vasculares en donde participa en la regulación de la presión arterial sistémica. (Yuhki y cols., 2011; Smyth y cols., 2012; Félétou y cols., 2011), así como interviene a nivel renal regulando la secreción de renina y la concentración de sales en la medula (Yu y cols., 2010).

Por otro lado, en otros modelos animales se observó que la inhibición no selectiva de COX por la administración de AINEs disminuyó la presión sanguínea en humanos y animales con estenosis

arterial renal (Wang y cols., 1999). Estudios, mostraron que la coartación aortica incrementa la expresión de COX-2 en la *mácula densa* y en la porción gruesa ascendente del asa de Henle y la inhibición de COX-2 reduce la actividad de renina y la presión sanguínea en este modelo de hipertensión vascular renal (Wang y cols, 1999).

6. ANTECEDENTES

Se ha propuesto que la COX-2 expresada en la *mácula densa* vía sus productos la PGE₂ y la PGI₂, modula la expresión de renina yuxtglomerular durante la restricción de sodio (Harris, 2008; Matzdorf y cols., 2007), la inhibición o interrupción genética de COX-2 reducen marcadamente los niveles de renina en plasma después de administrar una dieta baja en sales (Traynor y cols., 1999). Estudios en ratones con delección del gen COX-2 mostraron menor expresión de renina y concentración de renina plasmática, así como menor secreción de renina por estímulos agudos cuando disminuyó la Ang II al inhibir la ECA (Kim y cols., 2007; Cheng y cols., 2001).

Aunque estudios *in vivo* y *ex-vivo* han demostrado que los receptores EP2, EP4 o IP pueden inducir la liberación de renina (Hao y cols., 2008), en otros estudios se encontró que solo la delección del gen del receptor IP y no de los receptores EP2 y EP4 atenúa el desarrollo de la hipertensión, acompañado por reducción en la actividad de renina plasmática en el modelo de ratón hipertenso de 2 riñones 1 clip (2K1C) (Fujino y cols., 2004). En este mismo modelo también se demostró que los receptores AT₁ y AT₂ de la Ang II, así como el TXA₂ tienen un papel importante en el establecimiento de la presión arterial (Welch y cols., 2007). También se ha demostrado que los prostanoïdes participan en la hipertensión arterial dependiente de Ang II a nivel renal, en un modelo de inducción de la expresión de renina por medio de dieta (Opay y cols., 2006; Howard y cols., 2005).

Estudios posteriores mostraron que casi todos los mecanismos que inducen la liberación de renina, como la dieta baja en sales, la administración de diuréticos y la inhibición de la ECA incrementan la expresión de la COX-2 de la *macula densa* y de la porción gruesa ascendente del asa de Henle (Harris y Breyer, 2001).

La actividad COX-2 de la *mácula densa* no solo es un importante regulador de la síntesis y liberación de renina renal, sino también un blanco para la retroalimentación negativa del RAS incluyendo a la Ang II que inhibe la expresión de COX-2 vía los receptores AT₁, al aumentar el cotransportador Na-K-2Cl, incluso en células en cultivo de *mácula densa* de ratón (Wang y cols, 1999; Zhang y cols., 2006; Cheng y cols., 1999; Kovacs y cols., 2002) y activa las vías de señalización JNK en las que está implicada la ECA (Kohlstedt y cols., 2005). También hay reportes donde se regula la expresión de COX-2 en la *mácula densa* por el receptor renina/prorenina (Harris, 2008).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, que son importantes causas de mortalidad en México. Entre el 2000 y 2012, la prevalencia de HTA incrementó hasta afectar a 1 de cada 3 adultos mexicanos, de acuerdo con la encuesta nacional de salud y nutrición, la prevalencia actual es de 31.5% (ENSANUT, 2012).

Entre las alteraciones de la hipertensión primaria está el incremento de la actividad del RAS con aumento en la concentración de Ang II y aldosterona en 2-3 veces lo normal. Existen datos que indican que la inhibición de la COX-2 resulta en un aumento ligero de la presión sanguínea (Cheng y Harris, 2004; Höcherl y cols., 2002), y sugieren que el mecanismo es la retención de agua y sodio

por deficiencia de prostanoïdes derivados de la enzima (Harris., 2008); sin embargo, otros estudios han visto disminuci3n de la presi3n arterial en la hipertensi3n renovascular en ratas, por baja expresi3n de renina debida a inhibici3n de COX-2 (Wang y cols., 1999).

Estudios sugieren que la COX-2 de la *mácula densa* juega un papel crítico en el controlar de la renina renal y el sistema Ang II, manteniendo la homeostasis del fluido corporal y la presi3n sanguínea. Además, diversos grupos de investigaci3n han demostrado que la elevaci3n de la presi3n arterial en la hipertensi3n renovascular (Wang y cols., 1999) y en la hipertensi3n por inhibici3n del óxido nítrico (Guzmán-Hernández y cols., datos no publicados) se asocian con aumento de la expresi3n y la actividad de la COX-2 y renina en el riñ3n, sugiriendo que ambos sistemas enzimáticos contribuyen al desarrollo de la hipertensi3n arterial. Recientemente D'Abriel Ruíz-Leyja y cols., (2013) reportaron que la producci3n de prostanoïdes derivados de COX-2 en el riñ3n de ratas con hipertensi3n genética (SHR) está incrementada, planteando la posibilidad de la participaci3n de la COX-2 en la hipertensi3n primaria. Por el contrario, existe evidencia consistente que señala que la COX-1 no contribuye a la liberaci3n de renina en diferentes tipos de hipertensi3n secundaria que depende de la activaci3n del RAS. Por ello, en este estudio consideramos importante evaluar la expresi3n renal de la COX-2 y de renina en diferentes etapas del desarrollo de la hipertensi3n genética. Así mismo determinamos si existe una asociaci3n entre ambos sistemas enzimáticos con el uso de un inhibidor selectivo de la COX-2 el fármaco celecoxib y de la enzima convertidora de angiotensina el fármaco captopril, en la SHR prehipertensa, bloqueando de esta manera la intervenci3n del principal efector del sistema renina angiotensina, la Ang II. Además, decidimos evaluar si la COX-1 participa en la regulaci3n de la renina en la hipertensi3n primaria.

8. HIPÓTESIS.

Durante el inicio y desarrollo de la hipertensión arterial primaria se presentan alteraciones en la expresión de COX-2 renal que afectan la expresión de renina, lo que contribuye al establecimiento de la patología.

9. OBJETIVOS.

9.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar si existen alteraciones en la expresión de COX-1 y COX-2 renales que permitan relacionarlas con modificaciones en la expresión de renina, durante el desarrollo de la hipertensión arterial primaria.

9.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Evaluar la expresión del gen para COX-1 y COX-2 en corteza renal y su relación con la expresión del gen para renina a las 6 y 8 semanas de edad, y a los 3 y 5 meses de edad en ratas WKY y SHR.
- b) Determinar si los tratamientos por 2 semanas (celecoxib, 1 mg/Kg por día o captopril 30 mg/Kg por día), modifican la expresión de COX-1 y COX-2 y de renina en corteza renal de ratas WKY y SHR prehipertensas (6 semanas de edad).
- c) Identificar diferencias en la inmunolocalización de las proteínas COX-2 y renina en corteza renal de ratas WKY y SHR controles y tratadas.

10. METODOLOGÍA.

10.1 Material Biológico.

Se utilizaron 4-6 ratas por edad y cepa SHR y normotensas WKY de 6 semanas, 8 semanas, 3 meses y 5 meses de edad para realizar el curso temporal de la expresión de las COXs y renina, así como de 6 semanas para los tratamientos con celecoxib y captopril.

10.2 Reactivos.

Trizol Reagent y Kit DNA free fueron obtenidos de (Life Technologies, Carlsbad, CA, EU), Oligo (dT)₁₈, buffer de reacción 5X, inhibidor de RNasas –Ribolock, dNTPs 10mM y transcriptasa reversa MuLV RT fueron obtenidos de Thermo Scientific (Waltham, MA, EU); Universal Master Mix SYBR Green fue obtenido de Kapa Biosystems (Wilmington, MA, EU); paraformaldehído, poli-L-lisina y DEPC fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EU); etanol y xilol fueron obtenidos de JT Baker (Center Valley, PA, EU); Glicina fue obtenida de BioRad (Hercules, CA, EU); anticuerpo anti COX-2 fue obtenido de Biocare (Concord, CA, EU); anticuerpo anti-renina fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EU); anticuerpo anti IgG de conejo y anti IgG chivo fueron obtenidos de Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, EU); vectashield fue obtenido de Vector Labs (Burlingame, CA, EU).

10.3 Evaluación de la presión arterial.

A todas las ratas se les determinó la presión arterial sistólica en estado consciente por pletismografía no invasiva (Automatic blood pressure computer, LEICA, PanLab, España). La medición se realizó por triplicado en días diferentes en la semana previa a la disección del riñón.

10.4 Disección y perfusión del riñón.

Se canuló la arteria renal entrando por la arteria mesentérica superior, se disecó el riñón y se desencapsuló para eliminar las glándulas suprarrenales y el posible efecto de las hormonas liberadas por ellas; se colocó en una cámara para órgano aislado y se perfundió por 20 min para eliminar la sangre con ayuda de una bomba peristáltica con amortiguador de fosfatos tratado con dietil pirocarbonato al 0.1% (PBS-DEPC) para eliminar las RNasas,.

10.5 Aislamiento del RNA y Reverso transcripción (RT).

Se tomaron 50 mg de tejido de corteza de riñón para extraer el RNA total en Trizol reagent, de acuerdo al protocolo del proveedor, se cuantificó concentración y pureza en espectrofotómetro y se realizó una electroforesis con 2 µg de RNA en gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad de RNA al comparar los patrones íntegros de las bandas 28S y 18S, posteriormente se trató la solución de RNA total de acuerdo a las indicaciones del kit DNafree (Life Technologies, Carlsbad CA, EU) para eliminar la contaminación por DNA genómico.

Una vez evaluada la calidad del RNA se realizó la transcripción reversa, colocando 2µg de RNA en una mezcla total de 20 µl que contenía: 1 µl de Oligo (dT)₁₈, 5 µl de buffer de reacción 5X, 0.5 µl (20 UI) del inhibidor de RNasas –Ribolock, 4 µl de mezcla de dNTPs y 1 µl (20 UI) de la enzima transcriptasa reversa -M-MuLV RT, y se incubó el RNA por 5 min a 65°C con el oligo d(T)₁₈ y 1 h a 42°C con el resto de la mezcla.

10.6 PCR en tiempo real

Para amplificar el fragmento de COX-2 a partir del cDNA, se emplearon oligonucleótidos sintéticos de 21 pb, que delimitan un fragmento de 130 pb diseñados en nuestro laboratorio de acuerdo a la secuencia del gen de COX-2 de rata:

SENTIDO 5'- CCT TGA ACA CGG ACT TGC TCA -3' →

ANTISENTIDO 5'- TCT CTC TGC TCT GGT CAA TGG -3' →

Para amplificar el fragmento COX-1, se emplearon oligonucleótidos de 21 pb, que delimitan un fragmento de 108 pb (Tang y Vanhoutte, 2008), con la siguiente secuencia:

SENTIDO 5'- GGG AAA CTT AAG TAC CAG GTG -3' →

ANTISENTIDO 5'- CAT CTG CTT TTC GGG CGG GAC -3' →

Para amplificar el fragmento de renina se emplearon oligonucleótidos sintéticos de 20 pb que delimitan un fragmento de 211 pb, diseñados en nuestro laboratorio de acuerdo a la secuencia del gen de renina de rata:

SENTIDO 5'- TTC TCT CCC AGA GGG TGC TA -3' →

ANTISENTIDO 5'- CCC TCC TCA CAC AAC AAG GT -3' →

También se amplificó simultáneamente un fragmento de 106 pb del gen de la β -actina para ser empleado como control endógeno (Tang y Vanhoutte, 2008).

SENTIDO 5'- CGA GTC CGC GTC CAC CCG CGA -3' →

ANTISENTIDO 5'- GAC GAC GAG CGC AGC GAT ATC -3' →

La reacción de PCR en tiempo real se realizó con 1 μ l de cDNA en una mezcla de reacción que contenía 7.5 μ l del reactivo 2X master mix universal SYBR Green, 0.75 μ l de cada par de oligonucleótido (15 μ M) y agua grado biología molecular para un volumen total de 15 μ l, cada reacción se realizó por duplicado en el equipo Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research, San Francisco, EU).

Una vez obtenidos, los valores del ciclo umbral (Ct) cada enzima y del control endógeno para cada muestra, se calculó la cantidad relativa mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con respecto al grupo WKY de 6 semanas de edad en el caso del curso temporal, o con el grupo WKY control en el caso de los tratamientos farmacológicos.

10.7 Inmunolocalización de COX-2 y renina en corteza renal de WKY y SHR.

Posterior a la disección de los riñones, se tomó la mitad del órgano de cada rata y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS; posteriormente se deshidrataron con concentraciones graduales ascendentes de etanol, desde 30% hasta 100% 1 hora cada uno y se llevó el paso de aclaramiento del tejido con xilol, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3 μm en un micrótopo (Leica, Wetzlar, Alemania), para montar en laminillas tratadas con poli-L-lisina.

Los cortes se rehidrataron con xilol y etanol en series graduales descendentes de 100% a 70% y agua, posteriormente se realizó una recuperación antigénica por 1 min en olla de presión en buffer de citratos, se lavó con PBS 3 veces por 5 min cada vez y se permeabilizó por 15 min en tritón al 0.25% en PBS, nuevamente se lavó con PBS tres veces por 5 min y se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con glicina 0.1 M en PBS por 1 h, para incubar con un anticuerpo de conejo anti COX-2 o anticuerpo de cabra anti-renina dilución 1:100 a temperatura ambiente toda la noche, se realizaron 3 lavados con PBS, se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a FITC anti-IgG de conejo o anti-IgG de cabra según correspondía, finalmente se incubó con yoduro de propidio para marcaje de núcleos y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia vectashield y se observaron en Microscopio de Fluorescencia (Carl Zeiss) y Microscopio confocal (Leica).

Para identificar cambios en la expresión de la proteína se capturaron imágenes en 70 campos de cada corte histológico a 20X de magnificación, con n=3 de cada tratamiento. Se cuantificaron glomérulos positivos y negativos para obtener el porcentaje de glomérulos positivos, también se contaron túbulos renales positivos de 50 campos por riñón.

10.8 Administración de celecoxib y captopril.

Se tomaron tres grupos de ratas SHR y WKY, un grupo de cada cepa recibió en el agua de beber celecoxib (1mg/Kg de peso por día) a partir de la semana 6 hasta su sacrificio a la semana 8, otro grupo recibió captopril (30 mg/Kg de peso por día) y los grupos control recibieron el vehículo.

A la semana 8 se anestesiaron las ratas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), se canuló la arteria aorta a través de la arteria mesentérica y se extrajeron los dos riñones. Ambos fueron perfundidos por 20 min con PBS-DEPC para limpiarlos de sangre, en un equipo de órgano aislado. Posteriormente se pesaron y se obtuvieron fragmentos de 50 mg de corteza renal en tubos estériles para aislar RNA y realizar la reverso transcripción para identificar cambios en la expresión del RNAm de las COXs y renina, así como procesar el tejido por histología para identificar las proteínas COX-2 y renina por inmunofluorescencia.

10.9 Análisis de resultados.

En todos los casos, los resultados se analizaron mediante una prueba estadística de ANOVA de dos vías, empleando el software estadístico Sigma Plot versión 11.0, seguida de una prueba comparativa de Tukey.

Las barras representan la media \pm el error estándar de la media de 4-6 animales. Se consideró estadísticamente significativo los valores con una $P \leq 0.05$.

11. RESULTADOS.

11.1 Cambios en los niveles del mRNA de las COXs y renina en el curso temporal de la hipertensión arterial.

11.1.1 La presión arterial aumenta en las SHR a partir de las 8 semanas de edad.

Se midió la presión arterial de ratas WKY y SHR de las edades propuestas. La presión arterial aumentó significativamente en las ratas SHR a partir de las 8 semanas de edad en comparación con las WKY y SHR de 6 semanas de edad, aunque todavía en el rango normal. A partir de las 8 semanas de edad, la presión continuó aumentando, observándose aún cambios significativos a los 3 meses de edad cuando se alcanzan valores acordes con hipertensión arterial, a los 5 meses la presión se mantiene elevada ya sin observarse incrementos mayores(Figura 1).

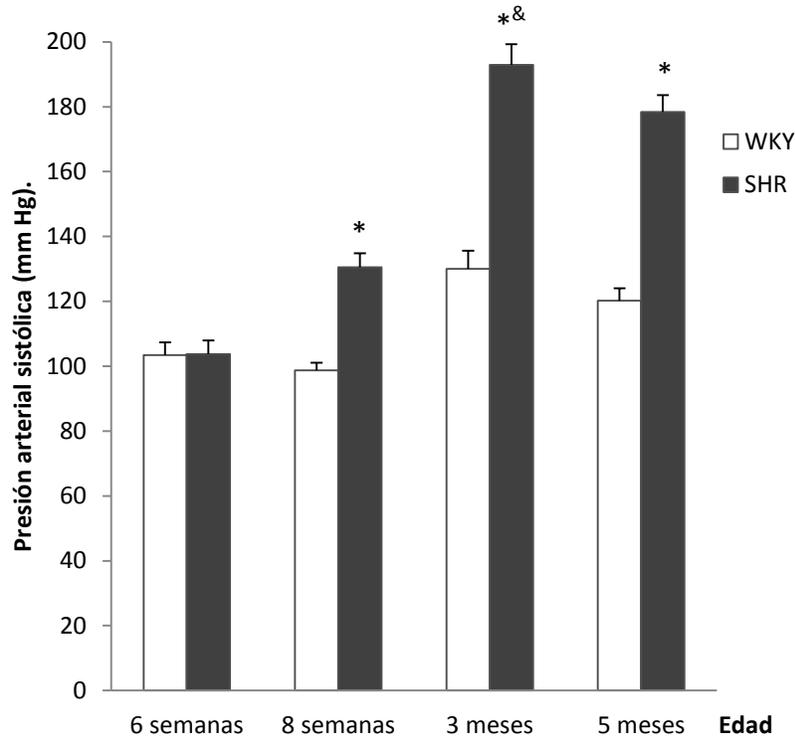


Figura 1. Presión arterial sistólica de ratas WKY y SHR evaluada en las edades experimentales. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. $n \geq 4$. * $P < 0.05$ vs WKY, & $P < 0.05$ vs SHR 8 semanas.

11.1.2 El RNA obtenido tiene la integridad adecuada para evaluar cambios en el RNAm.

Una vez obtenido el RNA de la corteza renal, se hizo la electroforesis en gel de agarosa para evaluar su integridad por el patrón correspondiente a las bandas de RNA 28S y 18S (Figura 2). Además se evaluó si había bandas de mayor peso molecular que indican contaminación con DNA genómico. Estos datos mostraron que las muestras utilizadas son adecuadas para sintetizar el DNAc por RT y PCR cuantitativa.

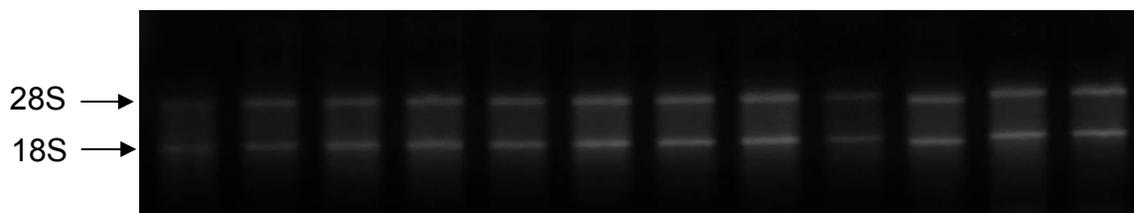


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total obtenido de la corteza renal. Se muestran las bandas 18S y 28S integras.

11.1.3 Los productos de la PCR tienen el tamaño esperado de acuerdo al diseño de los primers.

Se realizó la electroforesis de los productos de PCR en donde se puede ver que el tamaño de los fragmentos amplificados corresponde al tamaño esperado, de acuerdo al diseño de la secuencia de los primers para cada gen (Figura 3).

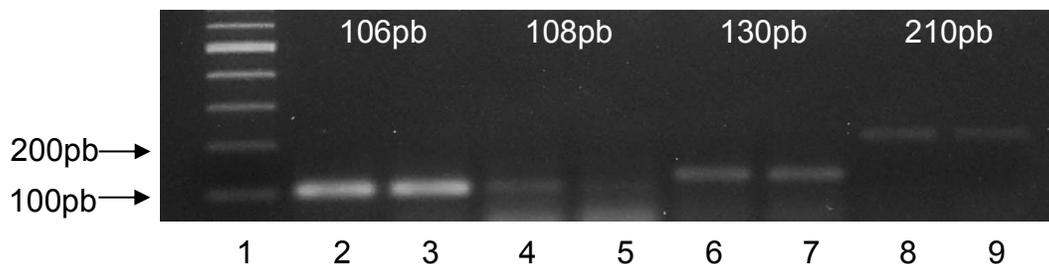


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los genes evaluados. Carril 1. Marcador de peso molecular (Ladder 100pb), carril 2 y 3 beta actina (106 pb), carril 4 y 5 COX-1 (108 pb), carril 6 y 7 COX-2 (130 pb), carril 8 y 9 renina (210 pb).

11.1.4 Los niveles de RNAm de COX-1, COX-2 y renina sufren modificaciones dependientes de la edad en la corteza renal de WKY y SHR.

Con la finalidad de analizar los cambios en los niveles del RNAm de las COX y renina en el desarrollo de la hipertensión, se hizo PCR en tiempo real para amplificar los fragmentos del gen endógeno β -actina y de las enzimas COX-1, COX-2 y renina en corteza renal de ratas normotensas WKY y SHR pre-hipertensas (6 semanas de edad), en proceso de desarrollo de la hipertensión arterial (8 semanas de edad) y con hipertensión arterial establecida (3 y 5 meses de edad). Para todas las edades, se obtuvo la cuantificación relativa de RNAm de cada enzima tomando como 1 el valor de las ratas WKY de 6 semanas.

Se observa la disminución de los niveles de RNAm de COX-1 dependiente de la edad para ambas cepas (Figura 4), siendo mayor a las 6 semanas de edad y menor a los 5 meses de edad. La disminución es estadísticamente significativa en las SHR a partir de las 8 semanas de edad. A las 6 semanas de edad, cuando las SHR aún son normotensas, se observa mayor expresión del RNAm para COX-1 comparado con las ratas WKY de la misma edad.

Para la COX-2 (Figura 5) se observa la disminución estadísticamente significativa de los niveles de RNAm en las ratas WKY a partir de los 3 meses de edad. En las SHR a las 6 semanas de edad se observa disminución en los niveles de COX-2 en comparación a las ratas WKY de la misma edad y posteriormente el nivel aumenta en las SHR a las 8 semanas de edad hasta un nivel equivalente de las WKY de la misma edad, lo cual coincide con el inicio de la elevación de la presión arterial y después vuelve a disminuir hacia los 3 y 5 meses hasta valores similares a las WKY en esta última edad.

En el caso de renina (Figura 6) durante el curso temporal, se observa la disminución en los niveles de RNAm dependiente de la edad, encontrándose el nivel máximo en ambas cepas a las 6 semanas edad, en las ratas SHR de esta edad también se encuentra disminuido el nivel de RNAm con respecto a las ratas WKY de la misma edad.

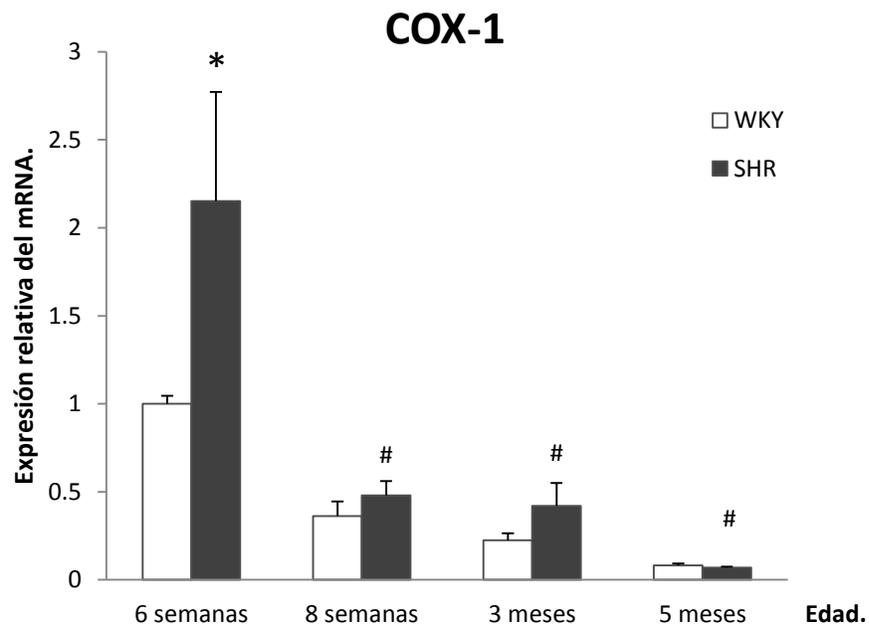


Figura 4. Niveles de RNAm de COX-1 en corteza renal de ratas SHR y WKY de las edades experimentales. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. $n \geq 4$. * $P < 0.05$ vs WKY de la edad correspondiente. # $P < 0.05$ vs SHR 6sem.

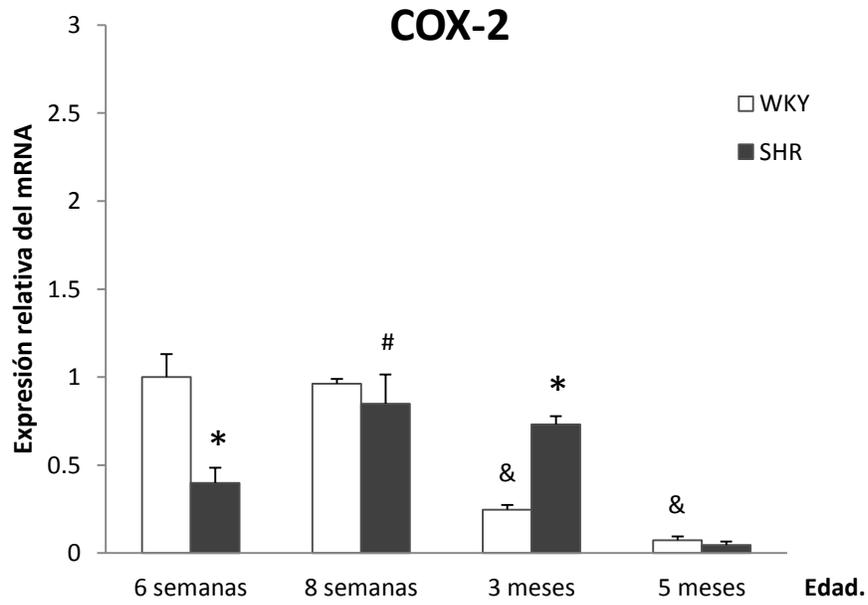


Figura 5. Niveles de RNAm de COX-2 en corteza renal de ratas SHR y WKY de las edades experimentales. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. $n \geq 4$. * $P < 0.05$ vs WKY de la edad correspondiente. & $P < 0.05$ vs WKY 6sem. # $P < 0.05$ vs SHR 6sem.

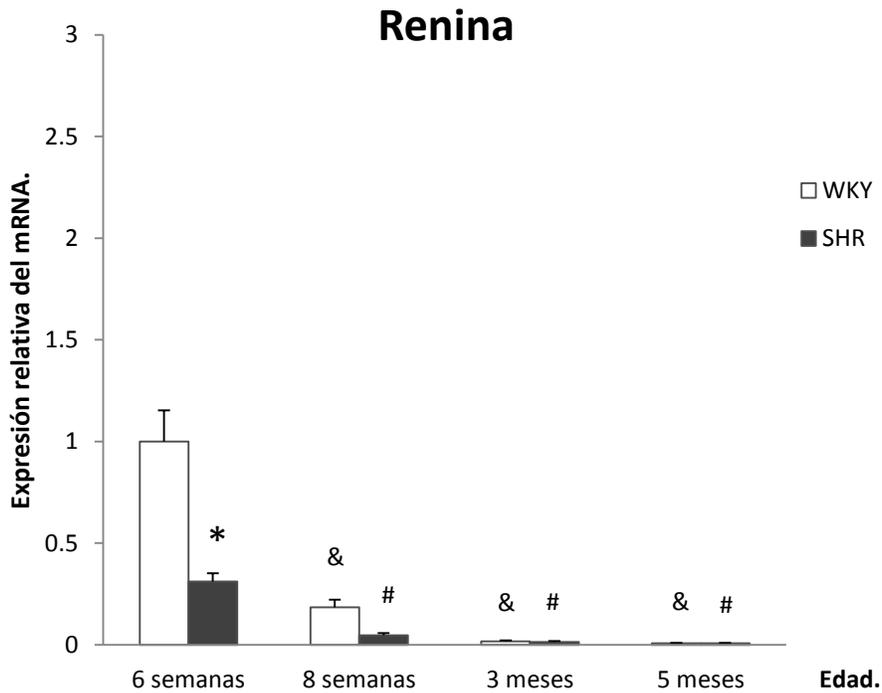


Figura 6. Niveles de RNAm de renina en corteza renal de ratas SHR y WKY de las edades experimentales. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media. $n \geq 4$. * $P < 0.05$ vs WKY de la edad correspondiente. & $P < 0.05$ vs WKY 6sem. # $P < 0.05$ vs SHR 6sem.

11.2. El tratamiento con celecoxib y captopril modifica las COX y renina en ratas con inicio de hipertensión arterial.

11.2.1 El tratamiento con captopril previno el aumento de la presión arterial en las ratas SHR.

Para profundizar en el estudio de la función que desempeñan las ciclooxigenasas y la renina en el desarrollo de la hipertensión arterial primaria, se administró celecoxib o captopril a ratas WKY y SHR de 6 semanas, edad en la que se presentan disminución en los niveles de RNAm de COX-2 y de renina en las SHR sugiriendo una posible asociación entre ellas, hasta las 8 semanas, cuando empieza el aumento de la presión arterial. Después de 2 semanas de tratamiento, a las 8 semanas de edad (figura 7), aumentó la presión arterial sistólica en las ratas SHR control y SHR tratadas con celecoxib en comparación con las ratas WKY ($P < 0.05$); mientras que el tratamiento con captopril en las SHR tratadas previno el aumento de la presión arterial. En las WKY no se presentaron cambios en la presión arterial aún con los tratamientos farmacológicos.

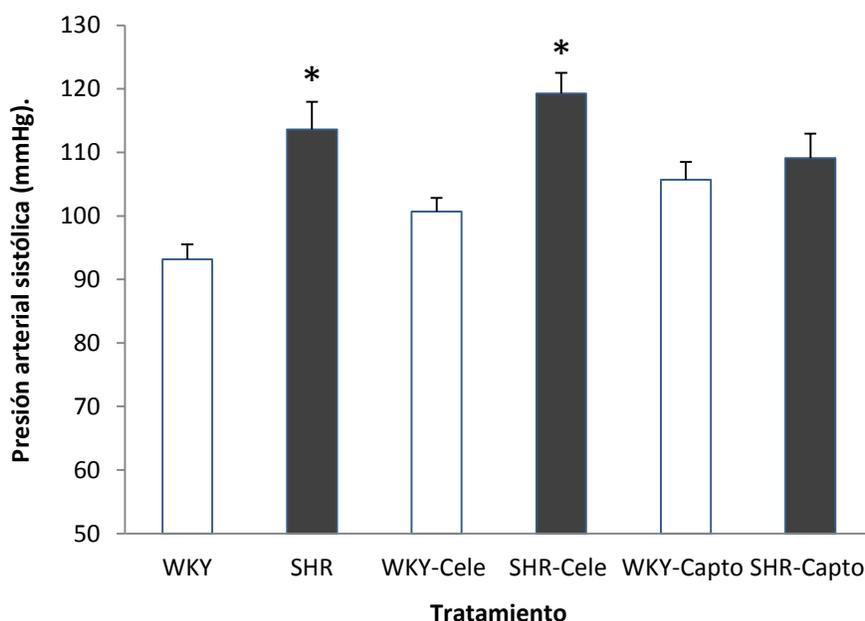


Figura 7. Presión arterial de ratas WKY y SHR a las 8 semanas de edad tratadas con celecoxib o captopril. WKY control (WKY), WKY + celecoxib (WKY-Cele), WKY + captopril (WKY-Capto), SHR control (SHR), SHR + celecoxib (SHR-Cele) y SHR + captopril (SHR-Capto). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media (sem). $n \geq 4$. * $P < 0.05$ vs WKY.

11.2.2 El tratamiento con celecoxib y captopril modifica los niveles de mRNA de COX-2 y renina, pero no de COX-1 en corteza renal de WKY y SHR.

A las 8 semanas de edad no se presentaron cambios en los niveles de RNAm de COX-1 en WKY o SHR en ninguno de los grupos (Figura 8). El tratamiento con celecoxib y captopril durante dos semanas aumentó la expresión de COX-2 en la corteza renal de las ratas WKY, mientras que en las SHR no se modificó (Figura 9). Por otro lado no se observan cambios estadísticamente significativos en los niveles de renina por efecto del tratamiento con celecoxib en ninguna de las dos cepas, mientras que el tratamiento con captopril provocó el aumento en la expresión de renina en WKY y SHR (Figura 10).

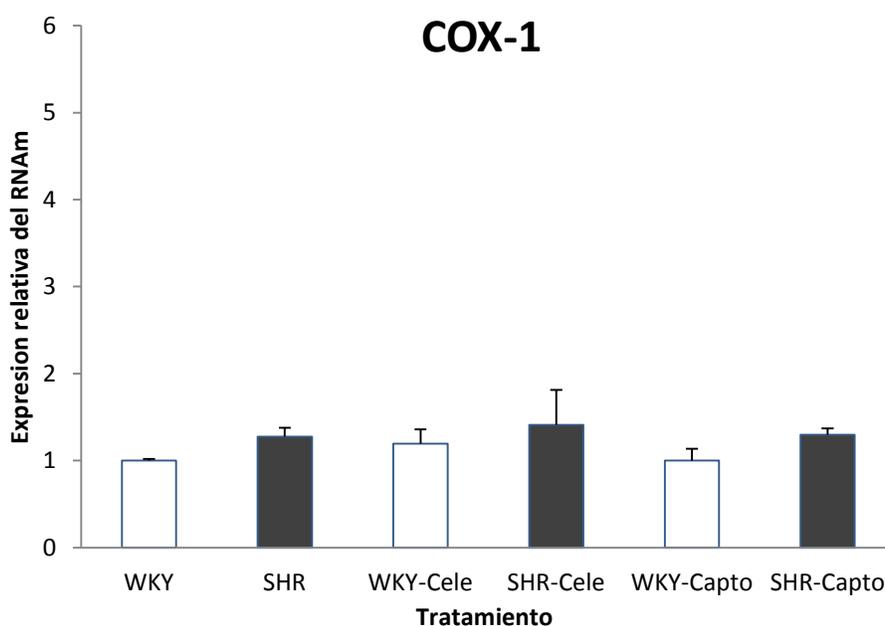


Figura 8. Niveles de RNAm para COX-1 en ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib. WKY control (WKY), WKY + celecoxib (WKY-Cele), WKY + captopril (WKY-Capto), SHR control (SHR), SHR + celecoxib (SHR-Cele) y SHR + captopril (SHR-Capto). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media $n \geq 4$. * $P < 0.05$ vs WKY.

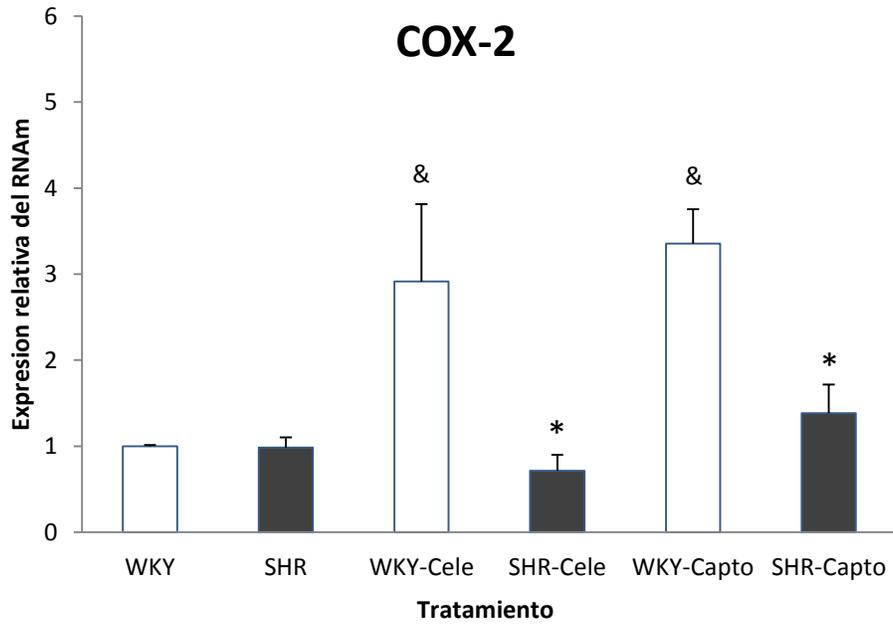


Figura 9. Niveles de RNAm para COX-2 en ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib. WKY control (WKY), WKY + celecoxib (WKY-Cele), WKY + captopril (WKY-Capto), SHR control (SHR), SHR + celecoxib (SHR-Cele) y SHR + captopril (SHR-Capto).. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media $n \geq 4$. & $P < 0.05$ vs WKY. * $P < 0.05$ vs WKY del tratamiento correspondiente.

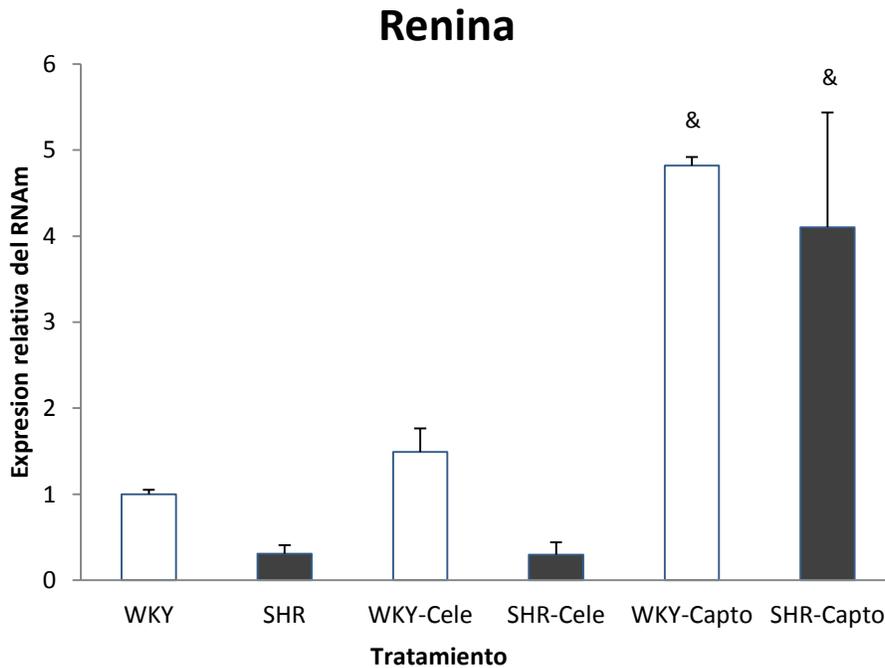


Figura 10. Niveles de RNAm para renina en ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib. WKY control (WKY), WKY + celecoxib (WKY-Cele), WKY + captopril (WKY-Capto), SHR control (SHR), SHR + celecoxib (SHR-Cele) y SHR + captopril (SHR-Capto). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media $n \geq 4$. & $P < 0.05$ vs WKY.

11.2.3 El tratamiento con celecoxib o captopril modifica la presencia de la proteína de COX-2 y renina detectada por inmunolocalización en la corteza renal de WKY y SHR.

Para determinar si se presentaban cambios en la proteína de las enzimas estudiadas, se realizó la detección por medio de la técnica de inmunofluorescencia de la proteína de COX-2 y renina. Se decidió no realizar la detección de la COX-1 dado que no se observaron cambios en sus niveles de RNAm por inhibición de la COX-2 o datos que sugirieran su relación con el RAS al inhibición de la ECA.

Al microscopio de fluorescencia, se observaron células con fluorescencia intensa característica del fluorocromo FITC, en el citoplasma para ambas enzimas, en acuerdo a la ubicación reportada como enzima de secreción en el caso de la renina (Figura 13) y unida al retículo endoplásmico rugoso y a la membrana nuclear en el caso de COX-2 (Figura 12). Se identificaron las células particulares mediante la tinción nuclear con el fluorocromo yoduro de propidio que se une al DNA y emite una señal roja.

Se observó, disminución en la cantidad de glomérulos con células de la *mácula densa* positivas a la proteína de COX-2 en las SHR, por efecto del tratamiento con celecoxib y aumento en el grupo tratado con captopril siendo estadísticamente significativo en las SHR (Figura 11 y 12). En el grupo tratado con captopril también se observó presencia de la proteína de COX-2 en túbulos distales (Figura 11C y 11F).

En el caso de renina aumentó en el número de glomérulos con células yuxtglomerulares positivas en las ratas tratadas con captopril, siendo significativo en las WKY comparada contra su control (Figura 13 y 14).

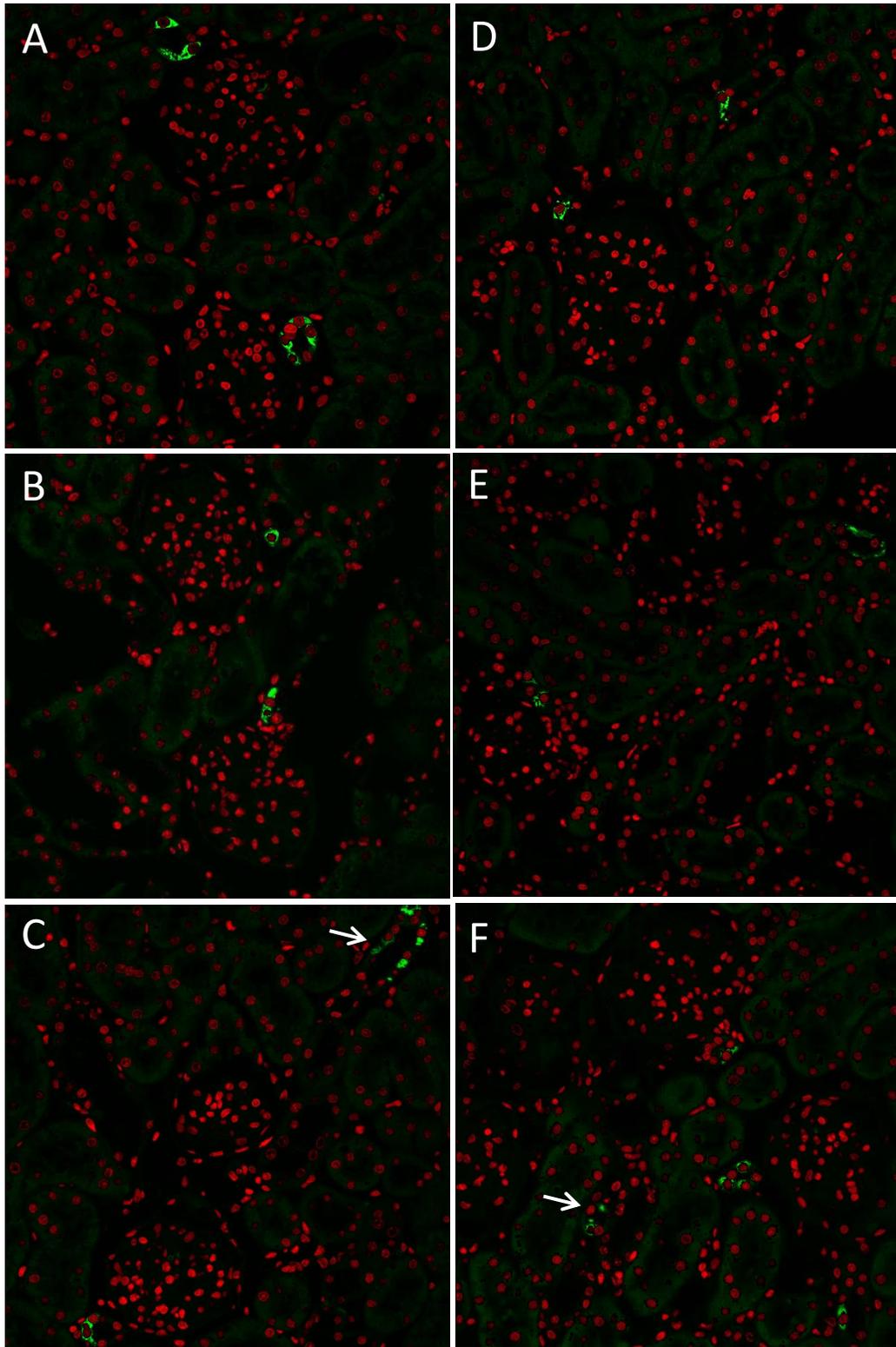


Figura 11. Localización de la proteína COX-2 por inmunofluorescencia en corteza renal de ratas WKY y SHR tratadas con celecoxib y captopril. Se observa la fluorescencia intensa en verde que indica la presencia de la proteína de COX-2 en la *mácula densa* y en túbulos distales (flecha) y en rojo los núcleos marcados con yoduro de propidio. (A) WKY, (B) WKY + celecoxib, (C) WKY + captopril, (D) SHR, (E) SHR + celecoxib y (F) SHR + captopril. Amplificación 40X.

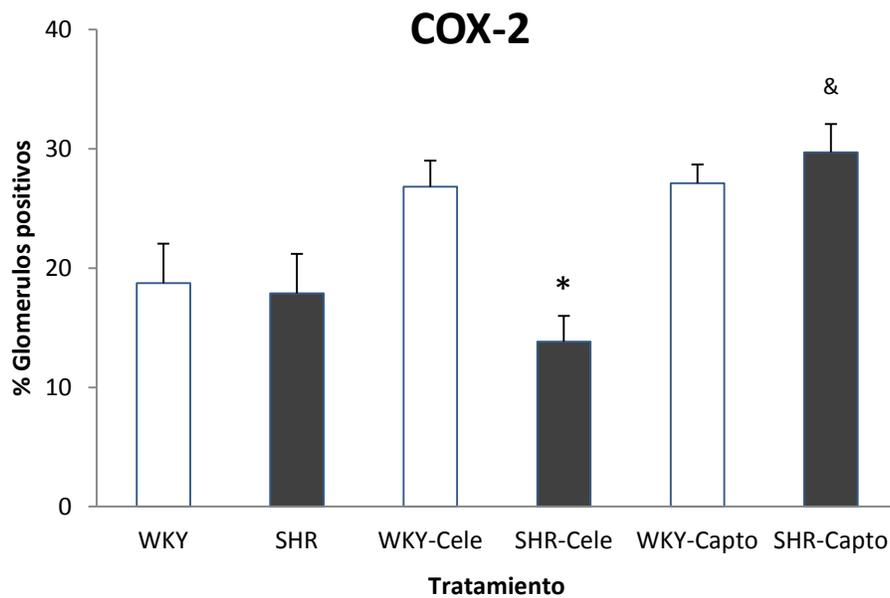


Figura 12. Porcentaje de glomerulos con células de la mácula densa positivas a la proteína de COX-2 de ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib. WKY control (WKY), WKY tratadas con celecoxib (WKY-Cele), WKY tratadas con captopril (WKY-Capto), SHR control (SHR), SHR tratadas con celecoxib (SHR-Cele), SHR tratadas con captopril (SHR-Capto). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media $n \geq 4$. $\&P < 0.05$ vs WKY, $*P < 0.05$ vs WKY del tratamiento correspondiente.

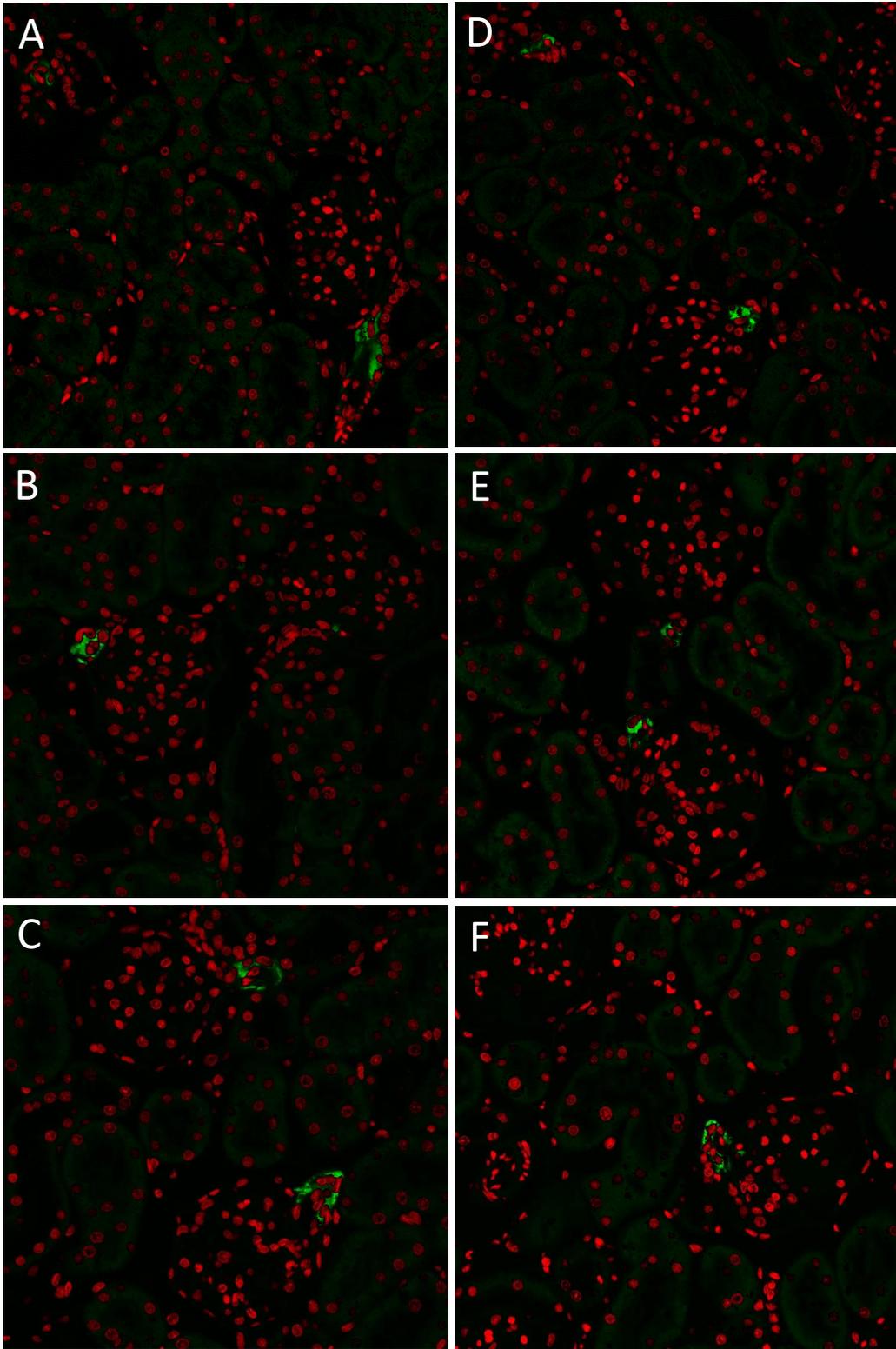


Figura 13. Localización de la proteína renina por inmunofluorescencia en corteza renal de ratas WKY y SHR tratadas con celecoxib y captopril. Se observa la fluorescencia intensa en verde que indica la presencia de la proteína de COX-2 y en rojo los núcleos marcados con yoduro de propidio (A) WKY, (B) WKY + celecoxib, (C) WKY + captopril, (D) SHR, (E) SHR + celecoxib y (F) SHR + captopril. Amplificación 40X.

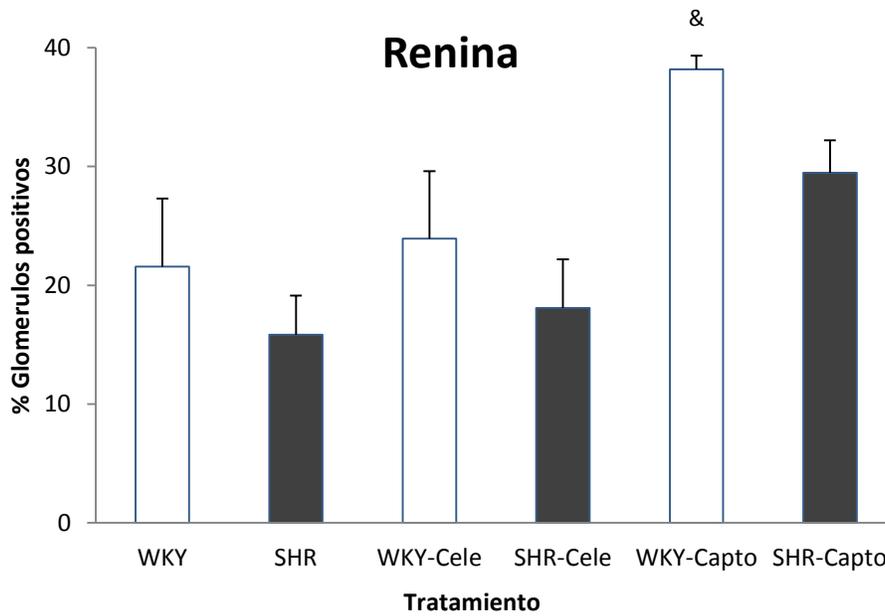


Figura 14. Porcentaje de glomérulos con células yuxtaglomerulares positivas a la proteína de renina, de ratas WKY y SHR de 8 semanas de edad con tratamiento de captopril o celecoxib. WKY control (WKY), WKY tratadas con celecoxib (WKY-Cele), WKY tratadas con captopril (WKY-Capto), SHR control (SHR), SHR tratadas con celecoxib (SHR-Cele), SHR tratadas con captopril (SHR-Capto). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media $n \geq 4$. $\&P < 0.05$ vs WKY.

Se hicieron cortes histológicos de los riñones y una tinción general para todos los grupos con la finalidad de identificar la estructura de la corteza con una tinción general y posibles alteraciones debidas al procesamiento. Se puede distinguir la estructura de la corteza renal, los glomérulos y los túbulos renales asociados (Figura 15).

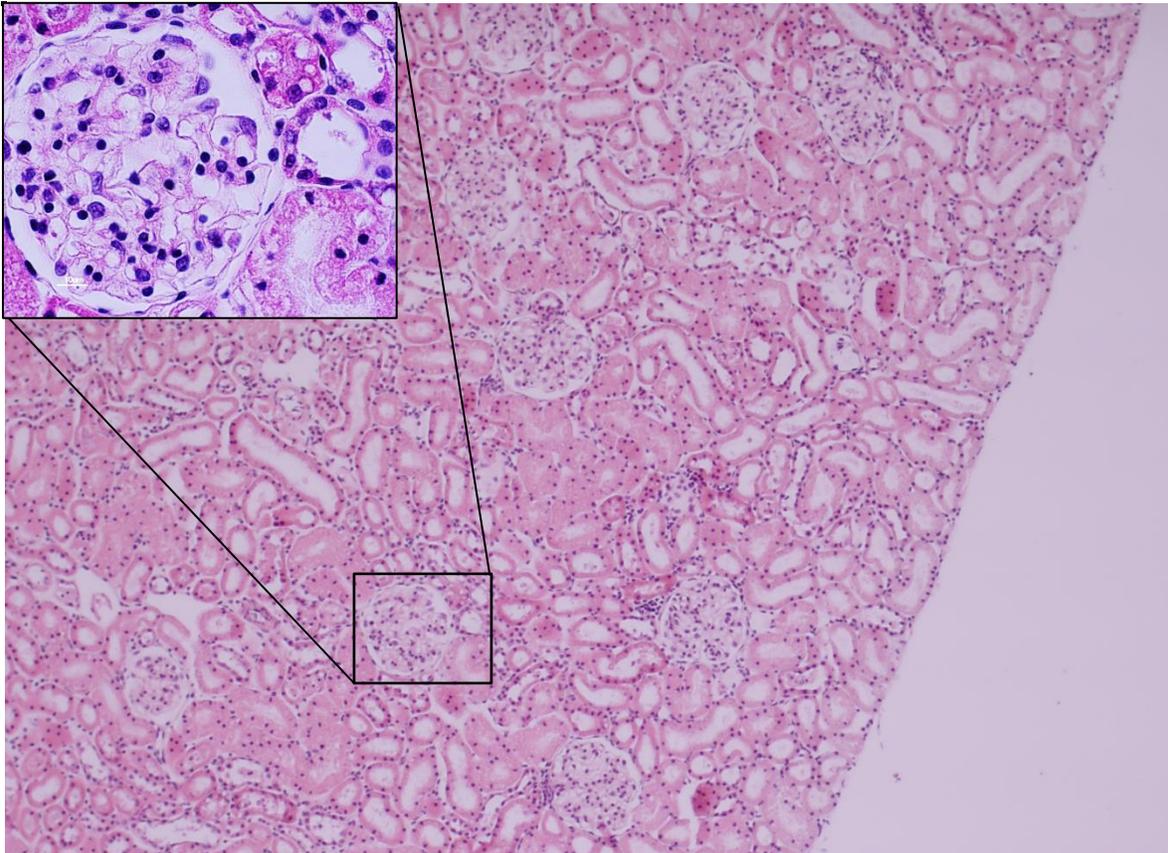


Figura 15. Estructura de un corte histológico de corteza renal de WKY de 6 semanas de edad. Se observa un corte histológico de riñón de rata WKY con una tinción H y E donde se distingue la corteza renal, se aprecia un glomérulo amplificado y los tubulos renales asociados, el citoplasma de las células en rosa y los núcleos en azul.

12. DISCUSIÓN.

En este trabajo, se decidió estudiar la relación de dos de los componentes más importantes del aparato yuxtaglomerular: la COX-2 y renina, durante el curso temporal de la hipertensión arterial, haciendo uso de uno los modelos de hipertensión arterial primaria más importante, las ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés).

La SHR, es el modelo experimental de hipertensión más parecido a lo que ocurre en el humano y es de gran importancia práctica, ya que no necesita dieta ni manipulación quirúrgica o de otro tipo en el riñón para inducir hipertensión. El curso clínico y los descubrimientos patológicos de las SHR, son similares a los observados en el humano, la presión sanguínea es relativamente normal en ratas jóvenes y se incrementa con la edad (Grollman, 1972). La cepa SHR, fue obtenida durante los años 60's por Okamoto y colegas por reproducción selectiva de ratas Wistar Kyoto (WKY) con elevada presión sanguínea, por lo que en todos los estudios las ratas WKY son empleadas como control. Al igual que en los humanos, la hipertensión en las SHR se presenta con la edad y la causa es desconocida, la presión sanguínea se empieza a elevar alrededor de las 5-6 semanas de edad y la presión arterial sistólica (PAS) alcanza valores entre los 180-200 mmHg en el adulto (Kundu y Rao, 2008). Como en el caso de la hipertensión humana, el riñón es el primer sospechoso en la fisiopatología de la hipertensión en las SHR, el trasplante renal de SHR a ratas Wistar ocasiona hipertensión y a su vez, el trasplante de un riñón normotenso a ratas SHR ocasiona que se normalice la presión arterial (Kundu y Rao, 2008). Entre las alteraciones que presentan las SHR, se encuentra su capacidad disminuida para excretar sodio cuando se administra una dieta alta en NaCl, esta retención de sales precede la hipertensión arterial (Rettig y cols., 1996).

En este trabajo, las SHR presentaron aumento estadísticamente significativo de la presión arterial a partir de las 8 semanas de edad y a los 3 y 5 meses ya mostraban los niveles característicos de

hipertensión arterial, mientras que las WKY mantuvieron niveles de presión arterial en el rango normal durante todo el estudio.

En el caso de COX-1, se observa una dependencia de los niveles de RNAm con la edad en ambas cepas, siendo mayor a las 6 semanas de edad y disminuyendo conforme avanza la edad. Hay aumento significativo en las SHR normotensas de 6 semanas de edad en comparación con las WKY de la misma edad, sugiriendo la participación de los prostanoïdes derivados de esta isoforma, en las alteraciones renales en etapas tempranas, que pueden estar contribuyendo al desarrollo de la hipertensión arterial, otra posible explicación puede ser que la elevación de COX-1 actúe como mecanismo compensatorio ante la disminución de COX-2 que ocurre en la misma edad. En la corteza renal la COX-1 se expresa en células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman, en células mesangiales glomerulares y células endoteliales de las arteriolas (Harris, 2006), en donde participa de manera constitutiva en el funcionamiento glomerular.

En cuanto a los niveles de RNAm de COX-2, también se observa disminución dependiente de la edad en las WKY, aunque a partir de los 3 meses de edad. En las SHR, se observa disminución significativa a las 6 semanas de edad, posteriormente aumenta a las 8 semanas de edad hasta un nivel similar a las WKY, etapa en la que comienza a elevarse la presión sanguínea, y continua su tendencia a disminuir hacia los 3 meses de edad, sin embargo el nivel es significativamente mayor en comparación con su control, alcanzando su valor mínimo una vez que la hipertensión se ha establecido a los 5 meses de edad.

En el caso de renina se observa un caso similar a COX-1 presentándose disminución de los niveles de RNAm desde las 8 semanas de edad, aunque contrario a lo que ocurre con COX-1, en las SHR de 6 semanas de edad el nivel del RNAm disminuye en comparación con las WKY de la misma edad.

La disminución de la expresión de COX-2 y renina en la corteza renal de las SHR de 6 semanas de edad, podría indicar la asociación entre ambos sistemas enzimáticos en esta etapa, como se ha reportado donde inhibir COX-2 disminuye la expresión y la actividad de renina plasmática (Matzdorf y cols., 2007). Sin embargo, no se puede descartar que pudiera estar ocurriendo una regulación de ambos sistemas de manera independiente. En este sentido, el aumento en Ang II plasmática, que se observa desde edades tempranas en la rata SHR (Castro-Moreno y cols., 2012), podría deprimir ambos sistemas, disminuyendo la expresión de COX-2 y de renina en la corteza renal (Green y cols., 2011), al estimular los receptores AT₁ en las células de la *macula densa* y en las células yuxtglomerulares respectivamente. Aunque, no se observan cambios en la presión arterial en esta edad por efecto de la Ang II, quizá por la presencia de otros sistemas que pueden compensar el efecto vasoconstrictor de la Ang II y por lo tanto el aumento de la presión arterial.

A los 3 meses de edad, cuando ya está establecida hipertensión arterial en las SHR, se observa aumento en la expresión de las COXs, siendo significativo el de COX-2 y sin cambios en la expresión de renina. Aunque el aumento de las COXs podría traducirse en la formación de PGI₂ y PGE₂, que pueden estimular la expresión de renina (Friis y cols., 2005; Schweda y cols., 2004), no podemos descartar, que en este sistema también esté alterada la expresión o actividad de la PGI sintasa o PGE sintasa y que el aumento de la COX-2, ocasione la acumulación de su producto directo la PGH₂, con potente efecto vasoconstrictor y natriurético que pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión arterial.

A los 5 meses de edad, disminuyeron significativamente ambas COXs, con menos producción de prostanoïdes que podría ocasionar alteraciones en la función normal del riñón, así como del sistema vascular que contribuirían a mantener la hipertensión arterial así como a las complicaciones renales y sistémicas asociadas; tampoco se puede descartar la participación de

prostaglandinas vasoconstrictoras derivadas del endotelio, que pudieran favorecer la hipertensión arterial, como se ha descrito en reportes, en que SHR de 9 meses de edad con hipertensión arterial presentan niveles elevados de COXs en endotelio, así como de sintasas de prostaglandinas endoteliales (Tang y cols., 2008). A esta edad (5 meses), no hubo cambios en la expresión de renina, previos estudios han reportado que la COX-2 no afecta la síntesis o liberación de renina, aunque sí podría intervenir en regular la actividad de renina plasmática en la hipertensión arterial ya establecida (Hartner y cols., 2003).

Es interesante que en animales jóvenes, normotensos de 6 semanas de edad se observen elevados los niveles del RNAm de las COXs y de renina y disminuyan con la edad, lo que podría deberse a que en edades tempranas, el riñón aún continúa en desarrollo y estos sistemas, pueden tener una contribución importante en regular la homeostasis del organismo ante un metabolismo acelerado, que va disminuyendo al avanzar el desarrollo, aunque es necesario realizar otros estudios para encontrar una explicación más clara a este respecto. Cabe destacar que es interesante que en etapas tempranas ya haya modificaciones en la expresión de COX-2 y renina en las ratas SHR en comparación con las WKY, lo que podría reflejar alteraciones en la fisiología normal del riñón que pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión arterial.

No existen reportes sobre la relación de dos sistemas tan importantes en la regulación de la función renal, como son la COX-2 y RAS en el curso temporal del desarrollo de la hipertensión arterial, sobre todo en un modelo de hipertensión primaria tan importante como las SHR, el tipo de hipertensión más común en el humano, por lo que este estudio nos puede permitir comprender algunos de las alteraciones que contribuyen al desarrollo de esta patología.

Para profundizar en el estudio de la función que desempeñan las ciclooxigenasas y la renina en el desarrollo de la hipertensión arterial primaria, se administró celecoxib o captopril a ratas WKY y

SHR de 6 semanas, edad en la que se presentan disminuidos los niveles de RNAm de COX-2 y de renina, sugiriendo una posible asociación entre ellas hasta las 8 semanas, cuando empieza el aumento de la presión arterial en las ratas SHR.

En las ratas WKY de 8 semanas de edad, no hubo cambios en la presión arterial entre los tratamientos y el control. En las ratas de la cepa SHR, la presión arterial empieza a incrementarse a las 8 semanas de edad y existe una diferencia significativa de los niveles de presión arterial entre las ratas WKY control y, los grupos SHR control y SHR tratado con celecoxib. En este sentido existen reportes sobre el aumento en la presión arterial por efecto de la inhibición de la COX-2 (Höcherl y cols., 2002). Con captopril se previno el aumento de la presión arterial a las 8 semanas de edad.

La expresión de COX-1 no muestra cambios significativos en ninguno de los grupos. Se ha propuesto que la expresión constitutiva de la COX-1 participa en las funciones normales, como protección de la mucosa gástrica y homeostasis de los electrolitos renales y se ha descartado su participación en la regulación del RAS, ya que el captopril incrementa la producción de renina en ratones knockout de COX-1 pero no de COX-2 (Cheng y cols., 2002).

Por otro lado, la expresión de COX-2 aumenta en las ratas WKY tratadas con celecoxib y captopril, mientras que en las ratas SHR no hubo cambios, aunque si una tendencia a disminuir con celecoxib y aumentar con captopril. El aumento en la expresión de la COX-2 ocasionado por celecoxib en las WKY puede deberse como ocurre en otros sistemas, a tratar de compensar la carencia de una molécula, en este caso por su inhibición, estimulando la producción de la misma, aunque deben realizarse otros estudios para elucidar este efecto más a fondo, empleando otros inhibidores de COX-2. Es interesante que el aumento en la expresión de la COX-2 se presente en las ratas WKY tratadas con captopril, lo que nos podría estar hablando de que la Ang II modula negativamente la

expresión de la COX-2 renal en condiciones normales, en tanto que en los animales hipertensos la Ang II parece no afectar a la expresión de esta enzima (Cheng y cols., 1999; Zhang y cols., 2006).

En cuanto a la expresión de renina se observa aumento de hasta 5 veces mayor en el nivel del RNAm por el tratamiento con captopril, en ambas cepas en comparación con controles. En contraste, la inhibición de la COX-2 con celecoxib no afectó la expresión de la renina en la WKY o en la SHR. Estudios llevados a cabo en animales normotensos o en diferentes modelos de hipertensión arterial, proponen que la COX-2 regula la síntesis de renina por diversos estímulos, como dieta baja en sal en condiciones normales o la coartación de la aorta. Nuestros resultados no apoyan esta hipótesis, ya que la inhibición de la COX-2 no modificó la expresión de renina en la WKY y SHR. Al igual que en las ratas WKY, hay aumento importante de la expresión de renina por inhibición de la ECA con captopril y por lo tanto de Ang II, lo que refuerza la suposición de que el aumento en la expresión de renina no depende de COX-2 y otros mecanismos como el sistema nervioso simpático pueden estar estimulando directamente a la renina (Castrop y cols., 2010), o en este caso al inhibir la formación de Ang II con captopril se bloquee la regulación negativa sobre la renina.

Al evaluar la expresión de las proteínas de COX-2 y renina, a través del porcentaje de glomérulos positivos a estas moléculas detectados con anticuerpos específicos, se observó una tendencia en la expresión proteica similar a la obtenida para el RNAm y el aumento es significativo para COX-2 y para renina en ratas WKY tratadas con captopril, aunque es necesario realizar pruebas de actividad para corroborar su funcionalidad. También aumentó la expresión de COX-2 en los túbulos contorneados distales de ratas tratadas con captopril, mientras que la expresión de renina se restringe a las regiones de células yuxtglomerulares, lo que sugiere que la COX-2 a través de sus

metabolitos podría estar siendo estimulado en esta región y contribuir en la regulación del volumen en los túbulos renales distales y al control de la presión arterial por captopril.

En un estudio con diferentes modelos de hipertensión arterial, entre ellos las SHR, utilizando el antagonista candesartan, selectivo del receptor AT_1 en diferentes edades, aumentó la expresión de COX-2 y renina dependiente de la edad, que no se modifica con celecoxib; los autores proponen que la expresión de renina y de COX-2 en la corteza renal está estrechamente relacionada entre sí, pero no existe dependencia directa, sugiriendo que existe un mecanismo en común que controla la expresión de ambas de manera independiente (Höcherl y cols., 2002), reforzando lo que se observa en nuestros resultados. Aunque existen resultados contradictorios al emplear otros inhibidores: Cheng y cols. (1999) si encuentran regulación de la expresión de renina por los metabolitos de COX-2 y atribuyen al tiempo de vida media del celecoxib la carencia de su efecto, por lo que se debemos tener en cuenta el empleo de inhibidores de COX-2 con tiempo de vida media más largos.

Sin embargo es necesario realizar otros estudios para dilucidar completamente la relación entre las COXs y renina durante el desarrollo de la hipertensión arterial primaria y su participación en esta patología.

13. CONCLUSIONES.

- Los niveles de RNAm de COX-1, COX-2 y renina son dependientes de la edad en ratas WKY y SHR, siendo mayores en edades tempranas y disminuyendo con la edad.
- A las 6 semanas de edad, hay menores niveles de RNAm de renina y COX-2 sugiriendo la posible relación de estas moléculas en un estado prehipertensivo, cuando el riñón mantiene su fisiología normal; mientras que se observan alteraciones en la expresión de las COXs y no de renina una vez que se ha desarrollado y establecido la hipertensión arterial.
- La inhibición de la ACE/Ang II con captopril, aumentó la expresión de COX-2 y renina en la corteza renal a las 8 semanas de edad, posiblemente por mecanismos no relacionados.
- Las proteínas COX-2 y renina, se encuentran en la corteza renal de ratas SHR y WKY, controles y tratados con celecoxib y captopril con niveles de expresión similares a la del RNAm.
- No se presenta una relación de regulación entre las isoformas de COX y renina en la corteza renal de ratas SHR, en las edades estudiadas.
- El presente estudio aporta información interesante sobre la posible participación de las isoformas de COXs y renina en el funcionamiento renal, durante el desarrollo de la hipertensión arterial.

14. REFERENCIAS.

1. Beierwaltes WH. The role of calcium in the regulation of renin secretion. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2010, 298:F1-F11.
2. Bradbury DA, Newton R, Zhu YM, El-Haroun H, Corbett L, Knox AJ. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous prostaglandin E2, E-prostanoid 2 (EP2), and EP4 receptors. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:49954-49964.
3. Castro-Moreno P, Pardo JP, Hernández-Muñoz R, López-Guerrero JJ, Del Valle-Mondragón L, Pastelín-Hernández G, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R. Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 2012, 32:61-69.
4. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev.* 2010, 90:607-673.
5. Chen BC, Chang YS, Kang JC, Hsu MJ, Sheu JR, Chen TL, Teng CM, Lin CH. Peptidoglycan induces nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via Ras, Raf-1, and ERK in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem.* 2004, 279(20):20889-20897.
6. Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest.* 1999, 103: 953-961.

7. Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC. Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2001, 280:F449-F456.
8. Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC. Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002, 283:R638-R646.
9. Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension.* 2004, 43:525-530.
10. Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68:1089-1100.
11. Conti F. Regulación de la presión arterial. En: *Fisiopatología médica*. 1ºed. Mc Graw Hill Interamericana de España S.L., 2010, pp. 1365-1377.
12. Costanzo LS. Fisiología renal. En: *Fisiología*. 1ºed. Elsevier España. 2011, pp. 235-297
13. D'Abril Ruíz-Leyja E, Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Gallardo-Ortíz IA, Estrada-Soto SE, Ibarra-Barajas M. Differential role of cyclooxygenase-1 and -2 on renal vasoconstriction to α_1 -adrenoceptor stimulation in normotensive and hypertensive rats. *Life Sci.* 2013, 93(16):552-557.
14. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000, 52(3):415-72

15. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011, 164(3):894-912.
16. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 1997, 30(3 Pt 2): 535-41.
17. Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006, 15(1):8-13.
18. Francois H, Athirakul K, Mao L, Rockman H, Coffman TM. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. *Hypertension.* 2004, 43(2):364-369.
19. Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nüsing RM, Skøtt O, Jensen BL. Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2005, 289:F989-F997.
20. Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, Hara A, Yamada T, Takayama K, Kuriyama S, Hosoki Y, Takahata O, Taniguchi T, Fukuzawa J, Hasebe N, Kikuchi K, Narumiya S, Ushikubi F. Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I₂ receptor IP. *J. Clin. Invest.* 2004, 114:805-12.
21. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008, 264(3):224-236.
22. Garavito RM, DeWitt DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1441:278-287.

23. Garavito RM, Mulichak AM. The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2003, 32:183-206.
24. Goodsell DS. The molecular perspective: cyclooxygenase-2. *Stem Cells.* 2000;18(3):227-9.
25. Green T, Gonzalez AA, Mitchell KD, Navar LG. The complex interplay between cyclooxygenase-2 and angiotensin II in regulating kidney function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2012, 21:7-14.
26. Grollman A. The spontaneous hypertensive rat: an experimental analogue of essential hypertension in the human being. En *Spontaneous hypertension*. 1° ed. Igaku Shoin LTD. Tokyo, Japon. 1972, pp. 238-242.
27. Guyton AC. Función dominante de los riñones en el control a largo plazo de la presión arterial y en la hipertensión. En *Guyton: Tratado de fisiología médica*. 12°ed. Elsevier España, 2011, pp. 657-660
28. Guyton AC. Función renal y micción. En *Guyton: Tratado de fisiología médica*. 12°ed. Elsevier España, 2011, pp. 657-660
29. Guyton AC. Regulación nerviosa de la circulación y control rápido de la presión arterial. En *Guyton: Tratado de fisiología médica*. 12°ed. Elsevier España, 2011, pp. 657-660
30. Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.* 2008, 70:357-377.
31. Harris RC, Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001, 281(1):F1-11.

32. Harris RC, Zhang MZ, Cheng HF. Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand.* 2004, 181(4):543-547
33. Harris RC. An update on cyclooxygenase-2 expression and metabolites in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2008, 17:64-69.
34. Harris RC. COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006, 47 Suppl 1:S37-42.
35. Hartner A, Cordasic N, Goppelt-Struebe M, Veelken R, Hilgers KF. Role of macula densa cyclooxygenase-2 in renovascular hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003, 284(3):F498-F502.
36. Hemstreet GP. Sistemas renal y urinario. En *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. 4° ed. Chantal Dufresne ediciones, 2001, pp. 8.1-8.14.
37. Höcherl K, Endemann D, Kammerl MC, Grobecker HF, Kurtz A. Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2002, 136:1117-1126.
38. Howard LL, Patterson ME, Mullins JJ, Mitchell KD. Salt-sensitive hypertension develops after transient induction of ANG II-dependent hypertension in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005, 288(4):F810-5.
39. Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:24965-24971.
40. Jackson EK. Renina y angiotensina. En *Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12° ed. Mc Graw Hill, 2012, pp. 789-821.

41. Jahnke K, Degen GH, Buehner M. Crystallization of prostaglandin-H synthase for X-ray structure analysis. *Environ Health Perspect.* 1990, 88:33-6.
42. Jia Z, Zhang A, Zhang H, Dong Z, Yang T. Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 increases sensitivity to salt loading and angiotensin II infusion. *Circ Res.* 2006, 99(11):1243-1251.
43. Kim SM, Chen L, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Low plasma renin and reduced renin secretory responses to acute stimuli in conscious COX-2-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007, 292:F415-22.
44. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007, 59(3):251-87.
45. Kohlstedt K, Busse R, Fleming I. Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension.* 2005, 45(1):126-132.
46. Kovács G, Peti-Peterdi J, Rosivall L, Bell PD. Angiotensin II directly stimulates macula densa Na-2Cl-K cotransport via apical AT(1) receptors. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2002, 282:F301-F306.
47. Kundu S, Rao P. The story of spontaneous hypertensive rat (SHR): A review. *Al. Ameen J. Med. Sci.* 2008, 1:65-66.
48. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem.* 1999, 274(33):22903-6.

49. Matzdorf C, Kurtz A, Höcherl K. COX-2 activity determines the level of renin expression but is dispensable for acute upregulation of renin expression in rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007, 292(6):F1782-F1790.
50. Nasrallah R, Clark J, Hébert RL. Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clin Sci (Lond).* 2007, 113(7):297-311.
51. Opay AL, Mouton CR, Mullins JJ, Mitchell KD. Cyclooxygenase-2 inhibition normalizes arterial blood pressure in CYP1A1-REN2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent malignant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006, 291(3):F612-F618.
52. Perrone MG, Scilimati A, Simone L, Vitale P. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Curr Med Chem.* 2010, 17(32):3769-3805.
53. Picot D, Garavito RM. Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. *FEBS Lett.* 1994, 346(1):21-25. Review.
54. Qi Z, Cai H, Morrow JD, Breyer MD. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension.* 2006, 48(2):323-328.
55. Qi Z, Hao CM, Langenbach RI, Breyer RM, Redha R, Morrow JD, Breyer MD. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest* 2002, 110(3):419-427.
56. Rettig R, Bandelow N, Patschan O, Kuttler B, Frey B, Uber A. The importance of the kidney in primary hypertension: insights from cross-transplantation. *J Hum Hypertens.* 1996, 10:641-644.

57. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med*. 2011, 30; 13:e11.
58. Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nüsing RM, Kurtz A. Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2004, 287:F427-F433.
59. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004, 56(3):387-437.
60. Siragy HM. AT(1) and AT(2) receptors in the kidney: role in disease and treatment. *Am J Kidney Dis*. 2000 Sep;36(3 Suppl 1):S4-S9.
61. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000, 69:145-182.
62. Smyth EM, Burke A, FitzGerald. Autacoides derivados de lípidos: Eicosanoides y Factor activador plaquetario. En Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12° ed. Mc Graw Hill, 2012, pp. 653-669.
63. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J. Biol. Chem*. 1999, 274:10911-10915.
64. Swan CE, Breyer RM. Prostaglandin E2 modulation of blood pressure homeostasis: studies in rodent models. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011, 96(1-4):10-3.
65. Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol. Genomics*. 2008, 32:409-418.

66. Traynor TR, Smart A, Briggs JP, Schnermann J. Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am. J. Physiol.* 1999, 277:F706-F710.
67. Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006, 38(10):1654-1661.
68. Vanhoutte PM. COX-1 and vascular disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009, 86:212-215.
69. Vikrant S, Tiwari SC. Essential Hypertension – Pathogenesis and Pathophysiology. *J. Ind. Acad. of Clin. Med.* 2001, 2 (3):140-161.
70. Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension.* 1999, 34:96-101.
71. Welch WJ, Patel K, Modlinger P, Mendonca M, Kawada N, Dennehy K, Aslam S, Wilcox CS. Roles of vasoconstrictor prostaglandins, COX-1 and -2, and AT1, AT2, and TP receptors in a rat model of early 2K,1C hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007, 293(5):H2644-H2649.
72. Wu KK. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005, 72(2):89-93.
73. Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am. J. Physiol.* 1998, 274:F481- F489.

74. Yang T. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and blood pressure regulation. *Kidney Int.* 2007, 72(3):274-278.
75. Yao B, Harris RC, Zhang MZ. Interactions between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and COX-2 in kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005, 288(6):R1767- R1773.
76. Ye W, Zhang H, Hillas E, Kohan DE, Miller RL, Nelson RD, Honeggar M, Yang T. Expression and function of COX isoforms in renal medulla: evidence for regulation of salt sensitivity and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006, 290(2):F542-F549.
77. Yu Y, Fan J, Chen XS, Wang D, Klein-Szanto AJ, Campbell RL, FitzGerald GA, Funk CD. Genetic model of selective COX2 inhibition reveals novel heterodimer signaling. *Nat. Med.* 2006, 12:699-704.
78. Yu Y, Stubbe J, Ibrahim S, Song WL, Smyth EM, Funk CD, FitzGerald GA. Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation and blood pressure homeostasis: targeted exchange of cyclooxygenase isoforms in mice. *Circ Res.* 2010, 106(2):337-345.
79. Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S, Ushikubi F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther.* 2011, 129(2):195-205.
80. Zewde T, Mattson DL. Inhibition of cyclooxygenase-2 in the rat renal medulla leads to sodium-sensitive hypertension. *Hypertension.* 2004, 44(4):424-428.
81. Zhang MZ, Yao B, Cheng HF, Wang SW, Inagami T, Harris RC. Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II AT(1) and AT(2) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103:16045-16050