



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN LAS DIFERENTES
ETAPAS DEL CICLO ESTRAL EN RATAS HEMBRA SHR
(SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT) Y SU CONTROL
NORMOTENSO WKY (WISTAR KYOTO).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
PRESENTA
TANIA ALEJANDRA ZUÑIGA PIMENTEL

ASESORAS:

MVZ Claudia Verónica Rivera Cerecedo
M en IBB Gabriela Xochitl Ayala Méndez



Ciudad de México, CDMX

2016



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.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Definición de la hipertensión arterial (HTA).....	3
Fisiopatología de la HTA.....	3
Factores inductores de la HTA.....	4
Genes	4
Factores ligados al propio individuo.....	5
Factores ambientales.....	5
Factores efectores de la HTA.....	6
Fenotipos intermedios.....	6
Fenotipos finales	7
Legislación en México (NOM-030-SSA2-2009)	8
Situación nacional (Secretaría de salud)	9
Situación mundial (OMS)	9
Modelos empleados para el estudio de la HTA	11
Las ratas SHR como modelo de la HTA y su control normotenso WKY.....	12
El monitoreo de la presión arterial por método no invasivo	13
Relevancia de la relación entre la HTA y el ciclo estral en las hembras SHR.....	14
El ciclo estral de los roedores.....	16
Regulación hormonal del ciclo estral.....	16
Citología vaginal en las etapas del ciclo estral.....	21

Etapas del ciclo estral (características celulares y duración)	21
Metodologías generales para la reproducción, crianza y alojamiento de las colonias de ratas SHR y WKY en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.....	24
Condiciones generales de alojamiento de animales	25
Importancia de las hembras en la investigación biomédica.....	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Modelo animal empleado.....	28
Obtención de células del cuello uterino (Citología vaginal)	29
Monitoreo de la presión arterial.....	30
Perfusión con formaldehído	31
RESULTADOS.....	34
Medias de la frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica, diastólica y media.....	35
Comparación de la presión arterial sistólica en cada etapa del ciclo estral de las ratas WKY y SHR	37
Diferencias en los valores de la presión arterial media en las 4 etapas del ciclo estral de las ratas WKY y SHR.....	39
Histopatología	39
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIÓN	51
REFERENCIAS.....	52
CUADROS	
Cuadro 1. Secuencia de acontecimientos que participan en el desarrollo de la hipertensión arterial.....	7
Cuadro 2. Clasificación de la hipertensión arterial conforme a lo establecido en la NOM-030-SSA-2009.....	8
TABLAS	

Tabla 1. Valores de frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica y diastólica en ratas WKY.....	34
Tabla 2. Valores de frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica y diastólica en ratas SHR	35
Tabla 3. Valores de presión arterial media en ratas WKY.....	37
Tabla 4. Valores de presión arterial media en ratas SHR.....	37
ESQUEMAS	
Esquema 1. Interacciones del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	20
FIGURAS	
Figura 1. Prevalencia de hipertensión arterial estratificado por grupos de edad.....	10
Figura 2. Prevalencia de la hipertensión, normalizada por edades en adultos de 25 años o más por región de la OMS y categoría de ingresos según el Banco Mundial; estimaciones comparables	10
Figura 3. El eje neuro-endocrino y el sistema porta Hipotalámico-Hipofisiario.....	17
Figura 4. El ciclo estral y su relación con las hormonas sexuales.....	21
Figura 5. Proporción relativa de cada tipo celular presente durante las 4 etapas del ciclo estral en la rata	23
Figura 6. Células presentes en la citología vaginal de las diferentes fases del ciclo estral teñidas con cristal violeta	23
Figura 7. Técnica de fijación por perfusión de un organismo completo.....	33
Figura 8. Comparación de la presión arterial sistólica en cada etapa del ciclo estral de las ratas WKY y SHR	36
Figura 9. Diferencias en los valores de la presión arterial media en las 4 etapas del ciclo estral de las ratas WKY y SHR.....	38
Figura 10. Cortes histológicos de arteria aorta.....	41
Figura 11. Cortes histológicos de corazón.....	42
Figura 12. Cortes histológicos de hígado.....	43
Figura 13. Cortes histológicos de riñón.....	44
Figura 14. Cortes histológicos de glándulas adrenales.....	45

RESUMEN

ZUÑIGA PIMENTEL TANIA ALEJANDRA. Comparación de la presión arterial en las diferentes etapas del ciclo estral en ratas hembra SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) y su control normotenso WKY (Wistar Kyoto) (bajo la dirección de la MVZ Claudia Verónica Rivera Cerecedo y la M en IBB Gabriela Xochitl Ayala Méndez).

Debido a la poca información reportada en ratas hembra de las cepas SHR y WKY; y a la importancia que tiene trabajar con ellas para estudios de la hipertensión en mujeres, resulta fundamental conocer el comportamiento de los valores de la presión arterial (PA) en las distintas etapas que conforman el ciclo estral. Algunas investigaciones muestran que la PA es mayor en los varones en comparación con mujeres premenopáusicas en edades similares.

Este trabajo aporta valores de PA de nueve ratas WKY y diez ratas SHR, que contribuyen al entendimiento del comportamiento de la PA durante el ciclo estral en hembras de estas cepas. Los resultados muestran que existen diferencias estadísticas significativas en la PA durante el estro y el diestro en las ratas WKY, en cambio en las SHR no se encontraron diferencias en las etapas del ciclo estral.

Por otra parte, se muestran los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina de corazón, arteria aorta, riñón, hígado y glándulas adrenales de dos ratas

SHR y una WKY. A la observación se encontró un incremento en el espacio de filtración del glomérulo renal y un ligero engrosamiento de la arteria aorta de la rata SHR adulta. Los órganos muestreados de las otras dos ratas no mostraron cambios relevantes.

Comparación de la presión arterial en las diferentes etapas del ciclo estral en ratas hembra SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) y su control normotenso WKY (Wistar Kyoto).

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) es un problema mundial de salud pública. Ésta contribuye al padecimiento de cardiopatías, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal; y a la mortalidad y discapacidad prematura (OMS 2013).

Fisiopatología de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica, caracterizada por un incremento continuo de las cifras de la presión sanguínea en las arterias, que conlleva a una serie de alteraciones metabólicas, ya que incide directamente sobre diferentes órganos, induciendo en ellos alteraciones patológicas. Dentro de ellas, el compromiso sobre el corazón (músculo cardíaco, vasculatura y tejido conectivo) se traduce en diferentes estadios que van desde la hipertrofia ventricular hasta la insuficiencia cardíaca (Farías, *et al.* 2003).

Esta enfermedad se caracteriza por la existencia de una disfunción endotelial, con ruptura del equilibrio entre los factores relajantes del vaso sanguíneo (óxido

nítrico-NO, factor hiperpolarizante del endotelio-EDHF) y los factores vasoconstrictores (principalmente endotelinas) (Wagner, *et al.* 2010).

La HTA es el resultado de un proceso en el que intervienen dos tipos de factores: los que inician los cambios en los valores de la PA, o inductores, y los que determinan la elevación de la PA, o efectores (Cuadro 1) (Díez, *et al.* 2001).

Factores inductores de la hipertensión arterial

Genes

La gran mayoría de las enfermedades en humanos tienen una base genética, pero aún dentro de una misma enfermedad hay variaciones, debido a que existe más de un gen implicado en su desarrollo (origen poligenético) o que la mutación de un solo gen origine la enfermedad (Díez, *et al.* 2001). Estudios familiares sugieren que el riesgo genético justifica entre el 30-40% de la variación de la PA entre individuos (Pamies, *et al.* 2003).

Los genes identificados se pueden clasificar en tres grupos: a) los que codifican enzimas implicadas en la síntesis de sustancias vasoactivas; como es el Gen de la Sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS); b) los que codifican receptores para sustancias vasoactivas, hormonas del metabolismo con propiedades vasoactivas y proteínas de señal acopladas a receptores, como son el Gen del receptor adrenérgico 1A y los que codifican para receptores de las hormonas del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona; c) los que codifican péptidos o proteínas con funciones diversas en la regulación de la homeostasis cardiovascular (precursores

de sustancias vasoactivas propiamente dichas, proteínas implicadas en la reabsorción renal de sodio, factores de crecimiento con propiedades vasoactivas y proteínas de transporte de lípidos con actividad vascular), como ejemplos están el Gen del canal epitelial de sodio y el Gen del Péptido Natriurético Atrial (PNA) (Díez, *et al.* 2001, Pamies, *et al.* 2003).

Factores ligados al propio individuo

También llamados endógenos, entre estos factores cabe señalar la raza negra, edad avanzada, el sexo masculino, estado hormonal (menopausia, resistencia a la insulina), obesidad y la dislipidemia. Entre estos destacan los hábitos alimenticios (elevada ingestión de sal y/o alcohol, baja ingestión de potasio y/o calcio), factores psicosociales (estrés) y factores relacionados con el grado de actividad física (sedentarismo) (Díez, *et al.* 2001).

Factores ambientales

Los factores ambientales se reconocen como agentes hipertensivos, es decir, que cuando se encuentran en un individuo con alguna variante genética facilitan la elevación de la presión arterial (PA) y el desarrollo de hipertensión (Díez, *et al.* 2001).

Entre los factores hipertensivos que dependen del medio, o exógenos, cabe señalar el lugar geográfico (la hipertensión es más prevalente en lugares de altitudes elevadas, incluso dentro de un mismo país) y el nivel sociocultural (que

se relaciona inversamente con la prevalencia y la morbimortalidad de la hipertensión) (Díez, *et al.* 2001).

Factores efectores de la hipertensión arterial

Fenotipos intermedios

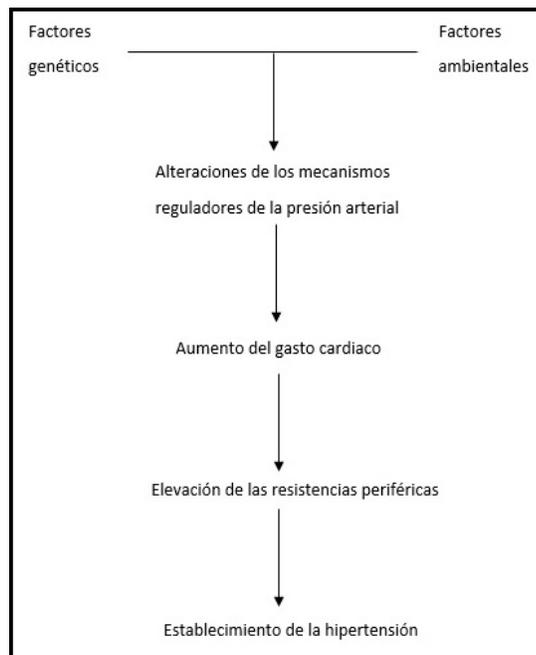
Entre los factores reguladores intermedios de la presión arterial, destaca el equilibrio entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras de origen endotelial, el control renal del volumen del líquido extracelular, el sistema nervioso simpático, la contractilidad del miocardio, y la estructura de la propia pared arterial.

En la patogenia de la HTA es necesario reconocer los siguientes fenotipos intermedios: disfunción endotelial con predominio de las sustancias vasoconstrictoras sobre las vasodilatadoras y una implicación relevante de las especies reactivas del oxígeno, retención renal de sal y agua propiciando la expansión del volumen del líquido extracelular, hiperactividad simpática, hipercontractilidad cardíaca y alteraciones estructurales de la pared arterial (Díez, *et al.* 2001).

Fenotipos finales

Los dos factores reguladores finales de la PA son el gasto cardíaco (GC) y la resistencia periférica total (RPT). Por tanto, en el proceso hipertensivo, los fenotipos finales resultantes son el incremento del GC y la elevación de la RPT. En estudios hemodinámicos efectuados por el grupo de Lund-Johanssen en amplios grupos de población seguidos durante varias décadas, se ha comprobado que en

la HTA existe una evolución cronológica de ambos fenotipos, de tal manera que en las fases iniciales del proceso es más importante el incremento del GC que el de la RPT, mientras que en las fases avanzadas sucede lo contrario (Lund, *et al.* 1995). Existen estudios que emplean estímulos como el ejercicio para investigar la respuesta dinámica del GC y de la RPT ante diferentes estímulos, como medio para establecer la inestabilidad de la hemodinámica sistémica y los posibles factores implicados en ello. En los sujetos normotensos el ejercicio se acompaña del aumento del GC y descenso de la RPT. En los sujetos con HTA ya diagnosticada, la respuesta al ejercicio se caracteriza por un incremento supranormal del GC y un descenso de la RPT. Un patrón similar de respuesta, aunque cuantitativamente menos intenso, se observa en los sujetos normotensos con antecedentes familiares de HTA, lo que refuerza el papel del genoma en el desarrollo y establecimiento de la HTA (Díez, *et al.* 2001).



Cuadro 1. Secuencia de acontecimientos que participan en el desarrollo de la hipertensión arterial. Modificado de Díez J. Lahera V. 2001.

Legislación en México

La Norma Oficial Mexicana 030-SSA2-2009 (NOM-030-SSA2-2009) tiene por objetivo establecer los procedimientos para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente, para el control de la hipertensión arterial sistémica y con ello evitar sus complicaciones a largo plazo. De acuerdo a esta norma la HTA se clasifica por cifras como lo muestra el Cuadro 2.

Categoría	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Presión Arterial Diastólica (mmHg)
Optima	<120	<80
Presión arterial normal	120 a 129	80 a 84
Presión arterial fronteriza	130 a 139	85-89
Hipertensión 1	140 a 159	90 a 99
Hipertensión 2	160 a 179	100 a 109
Hipertensión 3	≥180	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	<90

Cuadro 2. Clasificación de la hipertensión arterial conforme a lo establecido en la NOM-030-SSA-2009.

Situación Nacional

La 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. En tan sólo 6 años, entre el 2000 y 2006, la prevalencia de HTA incrementó 19.7% hasta afectar a 1 de cada 3 adultos mexicanos (31.6%) (ENSANUT 2012).

De acuerdo con el monitoreo realizado por la ENSANUT, la prevalencia actual de HTA en México es de 31.5%; es más alta en adultos con obesidad (42.3%) y en adultos con diabetes (65.6%). Además, se pudo observar que del 100% de adultos hipertensos 47.3% desconocía que padecía HTA. La prevalencia en los grupos de mayor y menor edad muestra diferencias; la prevalencia de la HTA fue 4.6 veces más baja en el grupo de 20 a 29 años de edad que en el grupo de 70-79 años (Fig. 1) (ENSANUT 2012).

Situación Mundial

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año. Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión causan anualmente 9.4 millones de muertes. La hipertensión es la causa de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatías, y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular. En 2008, en el mundo se habían diagnosticado con hipertensión aproximadamente el 40% de los adultos mayores de 25 años; el número de personas afectadas aumentó de 600 millones en 1980 a

1000 millones en 2008. La máxima prevalencia de hipertensión se registra en la Región de África, con un 46% de los adultos mayores de 25 años, mientras que la más baja se encuentra en la Región de las Américas, con un 35%. En general la prevalencia de la hipertensión es menor en los países de ingresos elevados que en los países de otros grupos de ingresos (Fig. 2) (OMS 2013).

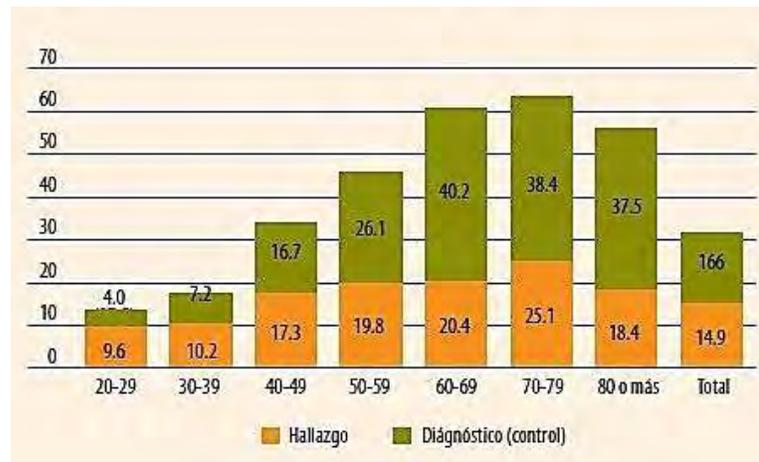


Figura 1. Prevalencia de hipertensión arterial estratificando por grupos de edad. ENSANUT 2012

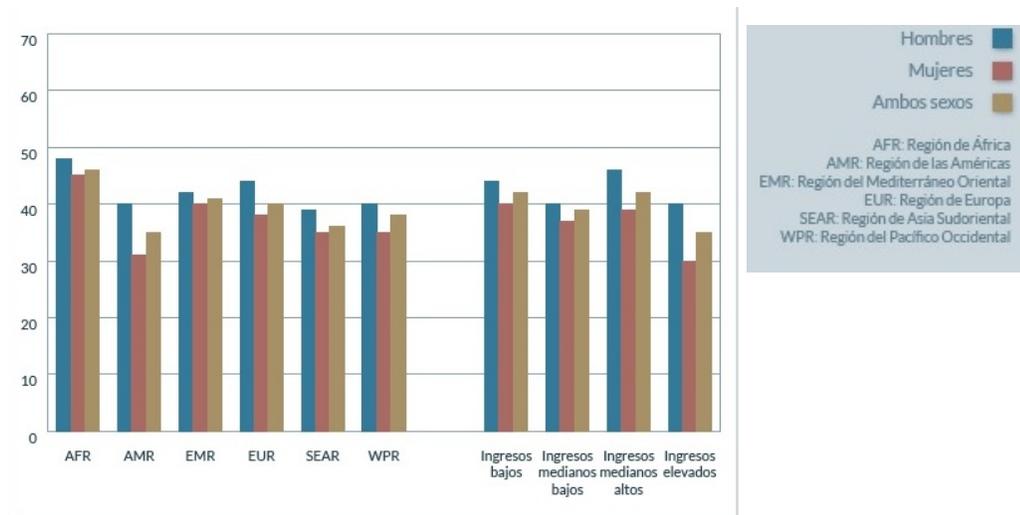


Figura 2. Prevalencia de la hipertensión, normalizada por edades, en adultos de 25 años o más por región de la OMS y categoría de ingresos según el Banco Mundial; estimaciones comparables, 2008. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles, 2010. OMS 2011.

Modelos empleados para el estudio de la hipertensión arterial

Con el objetivo de encontrar posibles mecanismos y nuevos fármacos para prevenir y controlar esta patología, se han desarrollado estrategias experimentales de hipertensión inducida en ratas, utilizando modelos animales como son: inhibición de la producción de óxido nítrico (Meirelles, *et al.* 2011), administración de dietas altas en sal en ratas Sprague Dawley (Rojas, *et al.* 2006, Dornas, *et al.* 2011), oclusión de la arteria renal (Waynforth, *et al.* 1992), entre otros. Además, se han diseñado modelos genéticos, como la rata espontáneamente hipertensa (SHR), siendo este uno de los más utilizados y consolidados para el estudio de la fisiopatología de la hipertensión arterial humana (Gálvez, *et al.* 2007).

El cuadro de hipertensión de la SHR presenta varias similitudes con la hipertensión arterial humana, como el incremento de la resistencia total periférica sin una expansión de volumen sanguíneo y una respuesta similar al tratamiento farmacológico. Estudios realizados *in vivo* han mostrado que, en las primeras fases de la hipertensión, esta cepa presenta un incremento del gasto cardíaco sin cambios en la resistencia periférica y cuando el padecimiento progresa a una situación de hipertensión establecida, el gasto cardíaco retorna a valores normales incrementándose la resistencia periférica total, de forma similar a lo que sucede en el ser humano (Gálvez, *et al.* 2007).

En dicha cepa sigue la misma progresión que en los pacientes humanos hipertensos, con una fase de prehipertensión seguida por una fase de desarrollo y un periodo donde la hipertensión está establecida, la hipertensión se desarrolla

más rápidamente en la rata macho que en hembras llegando a ser también más severa en ellos (Marín, *et al.* 2011).

Las ratas SHR como modelo de hipertensión arterial y su control normotenso WKY

Las ratas SHR se descubrieron en 1963, en la Universidad de Kyoto, por Okamoto y Aoki, cuando en una colonia de ratas Wistar encontraron a un macho con presión sistólica entre 145-175 mmHg y una hembra con presión de entre 130-140 mmHg; fueron seleccionados para apareamiento, la descendencia fue monitoreada y apareada entre hermanos que presentaron de manera sostenida la presión arterial elevada hasta la sexta generación, en la cual se obtuvo una meseta en los valores de la presión arterial por encima de 150 mmHg. La cepa fue obtenida en octubre de 1969 (Marín, *et al.* 2011).

La cepa WKY se estableció en 1971 como control normotenso. Se desarrolló a partir de una colonia Wistar Kyoto mediante apareamientos entre hermanos.

En cuanto a las características de la cepa SHR, son ratas albinas, endogámicas, a partir de la cuarta a sexta semana de edad la presión arterial sistólica se incrementa (Rojas, *et al.* 2006, Dickhout, *et al.* 2007); a partir de la semana 10 de edad dicha presión está por encima de 150 mmHg y es más severa en machos que en hembras. La hipertensión alcanza valores máximos (arriba de 180 mmHg) y se estabiliza entre las 16-20 semanas de edad (McGuire, *et al.* 1985).

En la hipertensión arterial humana se puede presentar hipertrofia cardiaca, infartos cerebrales e insuficiencia renal, en el caso de las ratas SHR entre los 6 y 24 meses de edad se llega a observar hipertrofia cardiaca (Rojas, *et al.*2006).

El monitoreo de la presión arterial por método no invasivo

Una forma confiable de obtener diversos parámetros fisiológicos en animales de experimentación, como la presión arterial, es mediante métodos directos. Sin embargo, estos métodos ofrecen desventajas como son: la utilización de anestésicos o tranquilizantes que pueden alterar dichos valores, la manipulación puede ser traumática para el animal y generarle estrés que modifica los valores reales de la PA, y potencialmente pueden causarles infecciones. Además, los catéteres pueden dañarse y no permitir un adecuado monitoreo de la PA (Van, *et al.* 2000).

Estas desventajas pueden eliminarse mediante un método de medición de presión arterial no invasivo, ya que permite monitorear y obtener las lecturas de este parámetro fisiológico, sin la necesidad de utilizar anestésicos o tranquilizantes que alteren los valores. Esto ofrece una gran ventaja para los estudios crónicos que requieren de diversas intervenciones experimentales en el tiempo que ameritan la sobrevivencia del animal de experimentación (Van, *et al.* 2000).

Los métodos no invasivos comerciales funcionan colocando un manguito esfigomanómetro en combinación con un sensor de flujo sanguíneo o de pulso

en la cola de la rata o ratón. En esta tesis, se empleó el equipo Panlab de Harvard Apparatus®. El equipo cuenta con un manguito o brazalete, que sirve para ocluir el paso de sangre, así como un transductor que sirve para seguir la evolución del pulso durante la medición. Hablamos de presión indirecta porque el valor de la presión arterial no se mide directamente dentro de la arteria sino se monitorea indirectamente en arterias periféricas a partir de la presión sistólica y la presión diastólica obtenidas gracias a la utilización del manguito y del transductor. Una vez obtenidos los valores de la presión sistólica (PS) y diastólica (PD), el sistema calcula automáticamente la presión arterial media mientras el brazalete se acaba de desinflar para la próxima evaluación. El valor de la presión media (PAM) se calcula utilizando la fórmula siguiente: $PAM = PD + 0.33(PS - PD)$. (Manual LE 5002 Pb Panlab). Para este fin, es necesario un calentamiento previo del animal que consiste en colocar a las ratas en cajas individuales de policarbonato con viruta sobre una almohadilla térmica durante 30-45 minutos a 38°C, para generar una vasodilatación periférica que facilite una señal óptima para la detección del pulso.

Relevancia de la relación entre la hipertensión arterial y el ciclo estral en las hembras SHR

Los valores de la PA entre machos y hembras son diferentes. En estudios de presión arterial ambulatoria en humanos, se ha descrito que la PA en los varones es mayor que en las mujeres de la misma edad (Khoury, *et al.* 1992) debido en gran parte a las hormonas sexuales. La interacción entre las hormonas ováricas y

la hipertensión es compleja, y existen algunos estudios encaminados a investigar los posibles efectos protectores de los estrógenos en la hipertensión. En las ratas macho SHR, la presión arterial media es mayor que la de las hembras (Pfeffer M, *et al.* 1977, Sullivan, *et al.* 2007) y se ha reportado que la gonadectomía reduce significativamente la PA en machos, mientras que en hembras no se han reportado cambios significativos de la PA con relación a ratas controles cuando las mediciones se realizan entre 3-8 semanas posteriores a la ovariectomía (Reckelhoff, *et al.* 2003). Existen reportes de que el aumento en la edad y la pérdida natural de los estrógenos, influyen en el incremento de la PA en las ratas hembra (Fortepiani, *et al.* 2003, Goldman, *et al.* 1977), ya que, con el envejecimiento, la disminución en la concentración de estrógenos en sangre va acompañado de un incremento en la PA lo que aumenta el riesgo de padecer hipertensión durante la menopausia, sugiriendo un papel protector del estradiol (Barton y Meyer, *et al.* 2009). En varios modelos de ratas ovariectomizadas se ha demostrado que la terapia de reemplazo con estrógenos ofrece múltiples beneficios sobre el sistema vascular, como es la disminución de la PA en ratas, la reducción del estrés oxidativo y la prevención de la disfunción endotelial (Hernández, *et al.* 2000, Morimoto, *et al.* 2004, Xu, *et al.* 2008).

La mayoría de los estudios sobre hipertensión en hembras son realizados en ratas ovariectomizadas, por lo que existen pocos reportes descriptivos en relación con los valores de la presión arterial en las diferentes fases del ciclo estral de la rata (Iams, *et al.* 1979).

De aquí la importancia de realizar este tipo de estudios de fisiología básica en las hembras SHR, ya que hasta el momento no existen reportes de los valores de su presión arterial, tomando en cuenta el ciclo estral.

El ciclo estral de los roedores

La rata es un mamífero poliéstrico continuo con ovulación espontánea, que alcanza la pubertad entre los 33 y los 42 días de edad, cuando tiene un peso aproximado de 100 g.

Al ciclo reproductivo de los roedores hembra se le conoce como ciclo estral y generalmente tiene una duración de 4 a 5 días. Este ciclo se divide típicamente en 4 etapas: diestro, proestro, estro y metaestro, también llamado diestro 1 (Goldman, *et al.* 2007).

Regulación hormonal del ciclo estral

Al igual que en otras especies de mamíferos, el ciclo estral en la rata está regulado por la interacción de varias estructuras, entre ellos el eje hipotálamo-hipófisis, el ovario y el útero (Galina, *et al.* 2008).

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un péptido hipotalámico que regula la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Las células neurosecretoras que sintetizan GnRH se localizan en el hipotálamo, y forman parte de los núcleos arcuato, periventricular, ventromedial y el área preóptica hipotalámica. La GnRH es transportada por los axones de

estas células hacia la región basal del hipotálamo, llamada eminencia media en donde se origina el llamado sistema porta-hipotálamo-hipofisiario que contiene capilares sanguíneos, penetra en un plexo primario de capilares fenestrados y después pasa a un segundo plexo capilar localizado en la parte distal pasando por el tallo infundibular, para llegar finalmente a la hipófisis anterior ó adenohipofisis, donde estimula la secreción de las hormonas FSH y LH en las células gonadotróficas (Prieto-Gomez, *et al.* 2002). El sistema porta-hipotálamo-hipofisiario es una región especializada del aparato circulatorio formada por dos grupos de capilares directamente conectados por un conjunto de vasos en donde la concentración de las hormonas liberadas permanece constante, mientras alcanzan su blanco (Fig. 3) (Berne y Levy, *et al.* 2012).

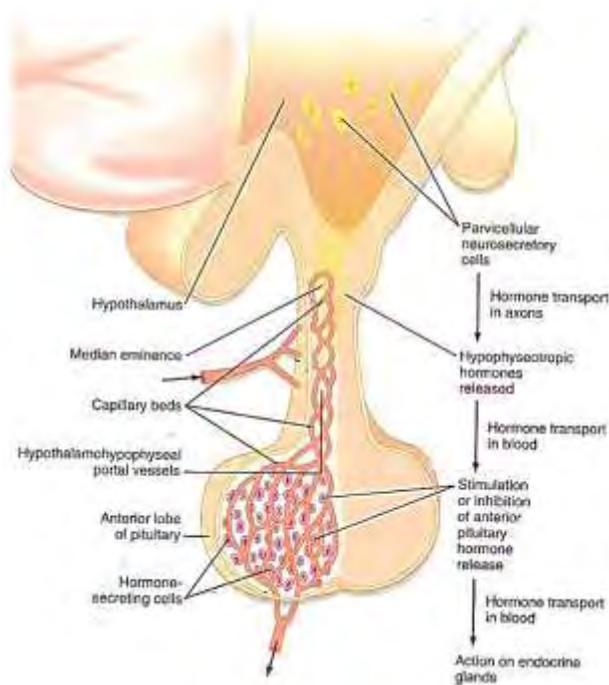


Figura 3. El eje neuro-endocrino y el sistema porta Hipotalámico –Hipofisiario. Berne y Levy. 2012.

La secreción de LH y FSH hacia el torrente sanguíneo es pulsátil, con picos de concentración que estimulan en las células ováricas la secreción de estrógenos y progestinas. La FSH promueve el crecimiento folicular y la producción del estrógeno estradiol que estimula el crecimiento y la maduración del endometrio. La LH induce la liberación de citocinas y de enzimas hidrolíticas de las células de la granulosa, para el rompimiento de la pared del folículo dentro del ovario (ovulación) y posteriormente esta hormona promueve la formación del cuerpo lúteo, así como la producción de progesterona. La secreción del estradiol de los folículos ováricos, junto con la secreción de progesterona del cuerpo lúteo tiene un importante efecto inhibitor sobre la secreción de LH. Así como la inhibina, la cual es secretada por las células de la granulosa de los folículos ováricos que, junto con el estradiol, inhiben la secreción de FSH (Esquema 1).

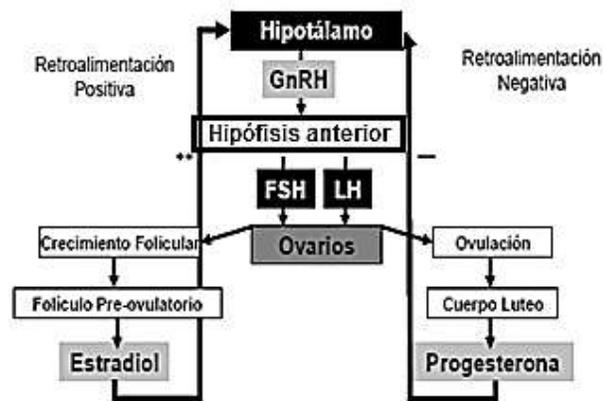
Desde el punto de vista endocrinológico el ciclo estral consta de dos fases: **la fase folicular y la fase lútea**. La **fase folicular** inicia con la regresión del cuerpo lúteo y finaliza con la ovulación. Durante esta fase ocurre la maduración folicular y la hormona dominante es el estradiol, esta fase comprende las etapas de proestro y estro. La **fase lútea**, donde la estructura predominante es el cuerpo lúteo y la hormona principal es la progesterona, comprende las etapas de metaestro y diestro (Fig. 4).

En las hembras no gestantes, la regresión del cuerpo lúteo está mediada por la secreción de prostaglandina $F_{2\alpha}$, metabolito producido por el endometrio que provoca la involución de dicha estructura, justo en esta etapa inicia el **proestro**. La

secreción de FSH y LH incrementa con la desaparición del cuerpo lúteo, y estimula el crecimiento folicular, lo cual produce un aumento de la secreción de estrógenos que induce el deseo de apareamiento y finalmente el inicio de la etapa de **estro o fase de celo**, que es un periodo de alta actividad y receptividad sexual que puede durar entre 12 a 24 h. El incremento de la LH es posterior a la aparición de las señales del celo, se produce la ovulación múltiple y espontánea e inicia el **metaestro**. En esta etapa, la concentración de estrógenos decrece e inicia la formación de cuerpos lúteos, lo que promueve la síntesis de progesterona, que indica el inicio de la fase **lútea** (en la etapa de **diestro**). Si no hay concepción, se produce la regresión del cuerpo lúteo, ocasionando que los niveles de progesterona decrezcan. El descenso en la concentración de progesterona, aunado a la baja concentración de estradiol, favorece nuevamente la secreción de GnRH por parte del hipotálamo, la que a su vez estimula en la hipófisis anterior la liberación de FSH y LH iniciando nuevamente la etapa de proestro.

Si la hembra queda gestante, el cuerpo lúteo se mantiene, así como las concentraciones elevadas de progesterona y se inhibe la aparición de un nuevo ciclo estral (Lucy, *et al.* 2006, Rippe, *et al.* 2009).

La adenohipófisis también secreta prolactina en las células llamadas lactotropos que juegan un papel importante durante la lactancia y la actividad del cuerpo lúteo en algunas especies. La concentración sérica basal de la prolactina aumenta con la duración de la luz del día (fotoperiodo), y por acción de los estrógenos.



Esquema 1. Interacciones hormonales del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Rippe 2009.

El fotoperiodo tiene una fuerte influencia sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, el pico de GnRH/LH está estrechamente ligado al reloj circadiano. El pico de LH ocurre en la tarde si la hembra tiene un nivel elevado de estrógenos en ese momento. Cuando las ratas se encuentran constantemente en la oscuridad presentan un ciclo estral con duración de 4 a 5 días, probablemente por la sincronización de LH que es controlada por el ciclo circadiano generado en el núcleo supraquiasmático (Krinke, *et al.* 2003).

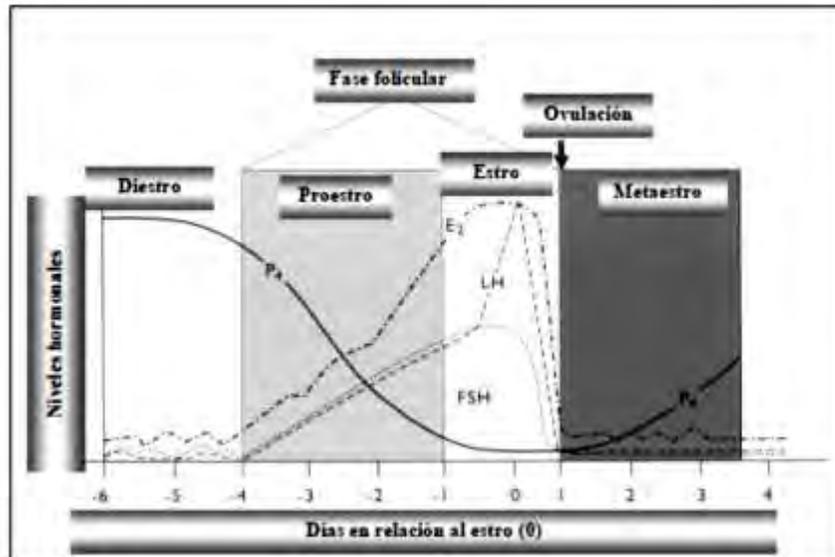


Figura 4. El ciclo estral y su relación con las hormonas sexuales. Senger. 1999.

Citología vaginal en las etapas del ciclo estral

Las etapas del ciclo estral en la rata y ratón se determinan por medio de citología vaginal, donde se observan los cambios dinámicos en la densidad de diferentes poblaciones celulares a lo largo del ciclo, que reflejan diferencias en los niveles de estradiol y progesterona secretados por los folículos ováricos, lo cual hace de la rata un buen modelo experimental para el estudio de la fisiología de los ciclos reproductivos (Fig. 5 y 6) (Cora, *et al.* 2015).

Etapas del ciclo estral

El proestro es una etapa de corta duración, la cual es identificada por la presencia de células epiteliales nucleadas pequeñas, redondas y de apariencia uniforme. En algunas ocasiones se pueden observar neutrófilos; esto indica que está

transitando de diestro a proestro. Dicha etapa tiene una duración de 14 horas (Cora, *et al.* 2015).

En el estro predominan las células epiteliales queratinizadas anucleadas, ocasionalmente se pueden observar células epiteliales nucleadas y algunos neutrófilos, el rango de duración de esta etapa es de 24 a 48 horas.

El metaestro es un estadio corto con una duración de 6 a 8 horas. Su frotis se caracteriza por células epiteliales nucleadas queratinizadas, las células alargadas que se presentan en el estro pueden estar presentes en baja cantidad. Conforme avanza el metaestro la cantidad de neutrófilos incrementa y el moco vaginal se torna más denso. En el metaestro tardío decrecen los neutrófilos y la densidad celular conforme se transita al diestro.

El diestro es un estadio largo que tiene una duración de 48 a 72 horas, caracterizado por una disminución de células epiteliales anucleadas queratinizadas, la cantidad de neutrófilos puede variar, pero son más altos en número relativo a las células epiteliales. En el diestro temprano, los neutrófilos pueden seguir apareciendo en agregados. En el diestro tardío, las células epiteliales se organizan en pequeños cúmulos (Cora, *et al.* 2015).

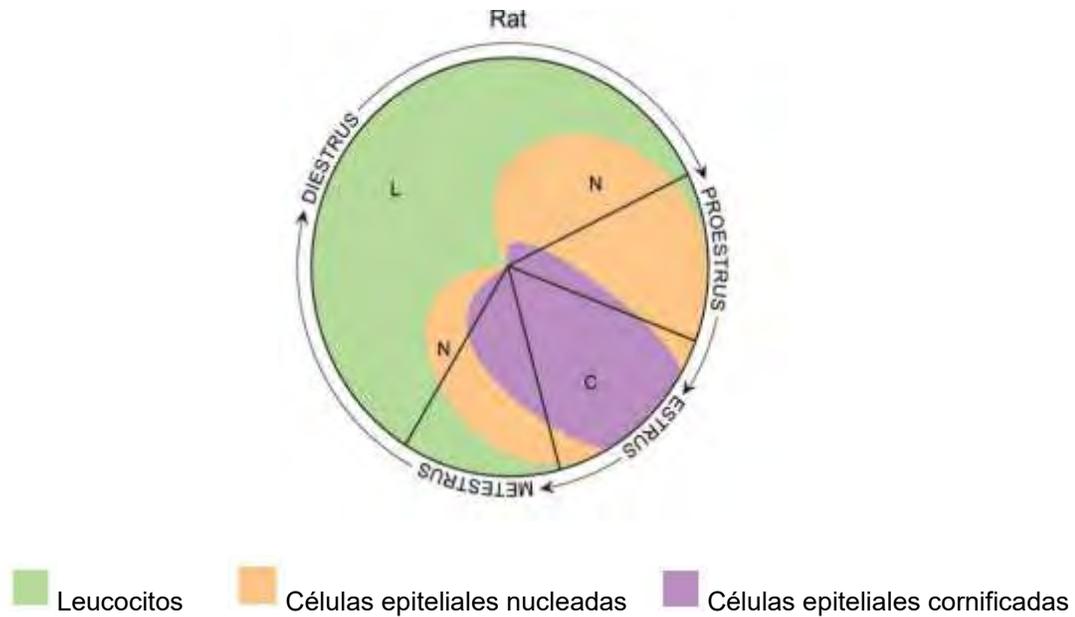


Figura 5. Proporción relativa de cada tipo celular presente durante las 4 etapas del ciclo estral de la rata. El tamaño de cada cuadrante no se correlaciona directamente a la duración de cada etapa. Cora. 2015.

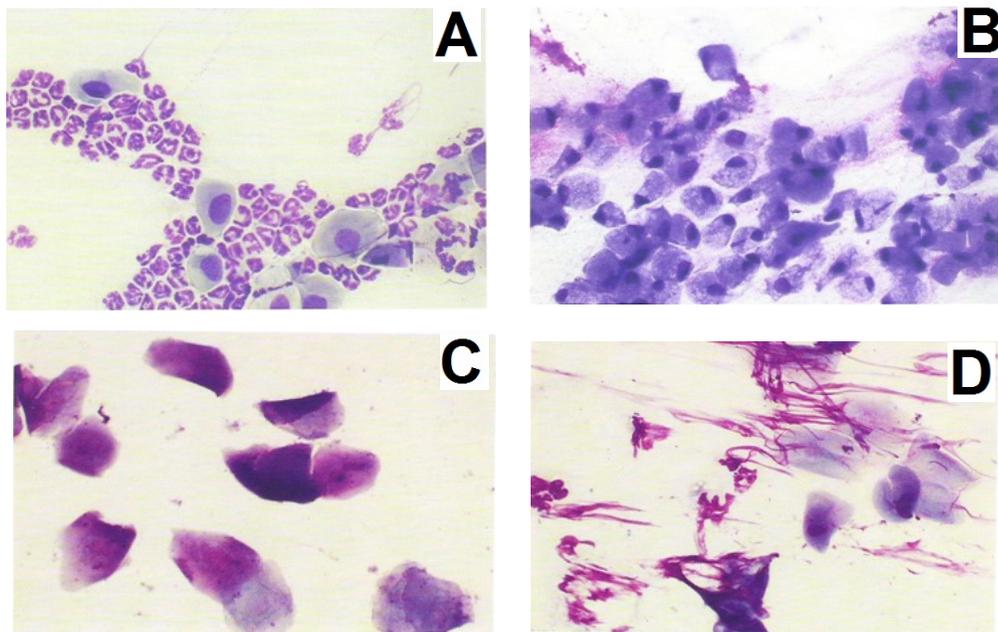


Figura 6. Células presentes en la citología vaginal de las diferentes etapas del ciclo estral teñidas con cristal violeta A) Diestro. Células epiteliales nucleadas y gran cantidad de neutrófilos. B) Proestro. Células epiteliales nucleadas y células primarias. C) Estro. Células epiteliales cornificadas D). Metaestro. Presencia de tres tipos celulares: células epiteliales nucleadas, neutrófilos y células epiteliales cornificadas. Pritchett-Corning Kathleen R. Chou Sonja T. Conour Laura A. Elder Bruce J.2011

Metodologías generales para la reproducción, crianza y alojamiento de las colonias de ratas SHR y WKY en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La reproducción en estas cepas endogámicas resulta complicada, teniendo como problemas principales el canibalismo de las crías y el abandono de las camadas, esto asociado a su hipertensión, nerviosismo y consanguinidad. En el Instituto de Fisiología Celular se ha logrado mantener exitosamente las colonias de ratas SHR y WKY que fueron importadas de “Charles-Rivers Laboratories”.

Las condiciones idóneas para el manejo reproductivo, mantenimiento y la expansión de las colonias de ratas SHR y WKY son el implemento de enriquecimiento ambiental, establecimiento de un ambiente tranquilo con un mínimo de variaciones ambientales, evitando el manejo excesivo, espaciando el cambio de cajas en hembras próximas al parto y con crías recién nacidas, además de manipular a las crías desde temprana edad para habituarlas al contacto humano desarrollando animales más dóciles (Marín, *et al.* 2011).

En mamíferos, se ha demostrado que el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis, adrenales (HHA), es esencial para el desarrollo de sistemas de defensa, escape y estrés por cambios en el medio ambiente. Varios estudios en roedores demuestran que la plasticidad neuronal y la programación de la expresión genética en estas vías celulares, está en gran parte influenciado por los cuidados maternos que las crías reciben de sus madres (Francis, *et al.* 2002). La separación de las

crías de su madre puede incrementar la actividad del eje HHA (Nishi, *et al.* 2014), aumentando la magnitud de las respuestas neuroendocrinas de miedo y estrés, así como la vulnerabilidad. Por estas razones, tratando de minimizar las condiciones de estrés, las camadas de ratas SHR se destetan a los 21 ± 5 días de edad y todos los integrantes permanecen juntos hasta los 45 días de edad en la misma caja donde se encontraba su madre, adicionalmente se ha reportado que la separación materna antes de la edad de destete, así como la poca interacción social entre los individuos (lo que se conoce como “reducción de las influencias ambientales excitatorias) reduce significativamente la PA en ratas SHR, sin embargo estos procedimientos realizados en ratas WKY (su control normotenso), no tienen efecto en su PA (Obrist, *et al.* 1981). Después de transcurrido este tiempo, los animales son separados en cajas según su sexo, para evitar apareamientos no programados, y se les colocan tubos de cartón para enriquecer su entorno, lo que incentiva conductas propias de su hábitat natural, como son: exploración, locomoción, atención, construcción de nidos, descanso, reducción de ansiedad y en machos, una disminución en las conductas agresivas hacia sus compañeros.

Condiciones generales de alojamiento de animales

Las ratas se encuentran alojadas en cajas de policarbonato, con hermanos de la misma camada. En los cuartos donde se encuentran los animales, cuentan con un sistema automatizado de ventilación que mantiene constantes la temperatura y la

humedad durante todo el año. La temperatura se mantiene entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, la humedad relativa es de 40-60% y los ciclos de luz/obscuridad se programan de manera automática cada 12 horas. Todos estos parámetros cumplen con los estándares internacionales del National Research Council.

Importancia de las hembras en la investigación biomédica

Como es conocido, ha habido una inclinación hacia el empleo de machos en la investigación biomédica durante mucho tiempo. Los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos están tratando de cambiar eso para lograr el equilibrio en el empleo de machos y hembras durante todas las etapas de la investigación. Como condición para recibir el apoyo económico por parte de los NIH, los investigadores ahora tienen que incluir a ambos sexos en sus estudios biomédicos (Clayton, *et al.* 2014).

Todavía en la década de los 90's, los investigadores temían que probar fármacos en mujeres que pudieran estar embarazadas o quedar embarazadas podría dar lugar a malformaciones del producto, por lo que los fármacos experimentales se probaron sobre todo en hombres. La investigación en animales siguió el mismo patrón. Según los NIH, más mujeres que hombres participan en los ensayos clínicos y responden a los medicamentos de manera diferente. Un estudio observó que los medicamentos que han sido retirados de la venta tienen efectos más graves en las mujeres. Se cree que los problemas que las mujeres experimentan

cuando toman medicamentos pudieran derivarse de cómo la investigación biomédica se lleva a cabo en las primeras etapas en los animales (Bichell, *et al.* 2016).

Algunos investigadores citan que las hembras han sido excluidas de los estudios debido a que sus ciclos hormonales pueden alterar los resultados (Clayton, *et al.* 2014)

Es por esto que Janine Clayton, Directora de la Oficina de investigación sobre salud de la mujer en los NIH y sus colegas, elaboraron una política a partir del 25 de enero del 2014 que aplica a los colaboradores de los NIH de la investigación biomédica, en la cual se está pidiendo que los científicos realicen sus investigaciones preclínicas en machos y en hembras, para comprender mejor el(los) efecto(s) de los tratamientos en ambos sexos.

Tomando en cuenta la importancia de la investigación en hembras, resulta fundamental el estudio de la presión arterial en las distintas etapas del ciclo estral en las cepas de ratas SHR y su control normotenso WKY, ya que la información existente en hembras de estas cepas es poca y es un modelo ideal para estudios de patologías que afectan a la mujer en relación con la hipertensión arterial.

HIPÓTESIS

- Los valores de la presión arterial en ratas SHR y WKY serán diferentes dependiendo de la etapa del ciclo estral en la que se encuentren debido a la posible influencia de las hormonas sexuales en la presión arterial.
- A mayor edad del animal, se observarán cambios histológicos en corazón, arteria aorta, riñón, hígado y glándulas adrenales, provocados por el aumento gradual de la presión arterial.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar las variaciones de la presión arterial en las diferentes etapas del ciclo estral en las hembras SHR comparándolas con su control normotenso WKY.

Los objetivos específicos comprenden:

- Determinar si existen diferencias significativas en los valores de la presión arterial entre las diferentes etapas del ciclo estral de las ratas hembras SHR y su control normotenso WKY.
- Identificar los cambios histopatológicos en estructuras anatómicas susceptibles al daño producido por la hipertensión arterial, como son: corazón, aorta, riñón, glándulas adrenales e hígado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal:

Los animales utilizados en el presente trabajo, fueron importados de "Charles-Rivers Laboratories" USA y han sido reproducidos y cuidados en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) desde el 2011 de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999. El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IFC revisó y aprobó el protocolo para la realización de este trabajo. Se emplearon 19 ratas, 10 hembras SHR y 9 del control normotenso WKY, de 16 semanas de edad para el monitoreo del ciclo estral y la presión arterial. Para obtener los órganos que fueron analizados histológicamente se emplearon: una rata SHR, una rata WKY de los grupos que fueron monitoreados de 9 meses de edad y una rata SHR de 2 meses de edad.

Obtención de células del cuello uterino (Citología vaginal)

La técnica empleada para la obtención de muestras fue la siguiente:

1. Fue requerido un émbolo de jeringa de insulina, el cual previamente humedecido con agua ozonificada, fue introducido en la vagina de la rata.
2. El émbolo se introdujo en la vagina de la rata, haciendo ligeros movimientos rotatorios para obtener una mayor cantidad de células.

3. La muestra fue extendida en un portaobjetos, de tal manera que pudiera quedar un campo lo suficientemente amplio para visualizar correctamente a las células.
4. La muestra obtenida se tiñó con una preparación de cristal violeta (0.1%) durante 1 minuto.
5. Fue enjuagada con agua ozonificada y observada al microscopio óptico para identificar las células.
6. En la observación al microscopio óptico se evaluó el tipo celular, la apariencia del moco y la presencia o ausencia de neutrófilos para diferenciar en qué etapa del ciclo estral se encontraba cada animal.
7. A estas ratas, se les realizó diariamente citologías vaginales y el monitoreo de la presión arterial, el procedimiento se realizó entre las 9 a. m. y 12p. m.

Monitoreo de la presión arterial

Fue empleada una técnica indirecta, la cual permite mediciones repetidas en varios animales y brinda valores fiables si las condiciones durante la medición son estrictamente controladas. Se utilizó un brazalete o manguito de presión para ocluir el flujo sanguíneo en un apéndice, en el caso de la rata la cola es el apéndice más conveniente para ocluir el flujo sanguíneo arterial.

Para realizar esta técnica se requirió:

- Una almohadilla térmica
- Una caja de policarbonato con poco material de cama

- Un dispositivo de restricción para la rata (cepo)
- Una caja de termostato para elevar la temperatura corporal de las ratas
- Un manguito pletismógrafo que se aplica en la cola de la rata
- Un transductor para detectar y medir la presión de oclusión

El equipo empleado fue el medidor de Presión LE 5002, Marca Pb Panlab® fabricado en España. Este equipo determina la frecuencia cardiaca, el valor de presión arterial sistólica, diastólica y la media.

Para obtener una vasodilatación periférica en las ratas, fue necesario el calentamiento previo a la realización del monitoreo (Marín, *et al.* 2011). Los monitoreos se realizaron a partir de las 16 semanas de edad diariamente, siempre y cuando estuvieran en una fase del ciclo estral establecida y no en transiciones de una etapa a otra, se registraron 4 mediciones de PA de cada animal por día.

Es importante mencionar que antes de comenzar a registrar los valores que fueron analizados estadísticamente, las ratas fueron adaptadas al procedimiento completo que involucra la realización diaria de la citología vaginal, el calentamiento previo al monitoreo de la presión arterial, el manejo de introducción al cepo de contención, la colocación del manguito pletismógrafo en la cola y al sonido del equipo medidor de la presión arterial. Al término de cada medición, las ratas fueron premiadas con una bolita de cereal.

Perfusión con formaldehído

Obtención de estructuras anatómicas

Una vez obtenidos las mediciones de la PA durante 4 ciclos estrales completos, fue realizada la eutanasia a los animales. Se realizaron perfusiones en 3 ratas, una WKY, una SHR de 9 meses de edad y una SHR de 2 meses de edad, empleando anestesia general con Clorhidrato de Ketamina e Hidroclouro de Xilacina a una dosis de 7-10 mg/kg. Los animales se perfundieron con ayuda de una bomba peristáltica con solución salina isotónica (0.9%) para eliminar la sangre de los tejidos, posteriormente se fijaron con formaldehído al 10%. Con este procedimiento, se pueden fijar los tejidos de un animal completo introduciendo el formaldehído al 10% a través del ventrículo izquierdo del corazón, ya que la solución se distribuye a través del sistema circulatorio a todas las células del cuerpo (Fig. 7). Posteriormente, se procesaron las muestras histológicas en parafina de las siguientes estructuras anatómicas: corazón, aorta, riñón, glándulas adrenales e hígado, los cuales fueron teñidos de manera rutinaria con la técnica Hematoxilina-Eosina (H-E) (Montalvo, et al. 2010).

Técnica:

1. Una vez anestesiada la rata y alcanzado el plano quirúrgico, se colocó en posición decúbito dorsal sobre una rejilla adecuada para la colección de líquidos de lavado y fijación.
2. Se sujetaron a la rejilla las extremidades del animal.

3. Se realizó un corte por línea media en la cavidad torácica, desde la entrada del tórax hasta la apófisis xifoides, se separó la piel, se cortaron las costillas a manera de exponer los pulmones y el corazón.
4. Se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo del corazón para perfundir la solución de lavado.
5. Se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y de los líquidos de lavado.
6. Se procedió al lavado con la solución salina por 15-20 minutos a un flujo de 2.5 ml/min.
7. Posteriormente se realizó la perfusión con formaldehído al 10% a la misma velocidad que la solución salina durante 20 minutos.
8. Se retiró la aguja del ventrículo izquierdo y se procedió a la extracción de los órganos deseados.

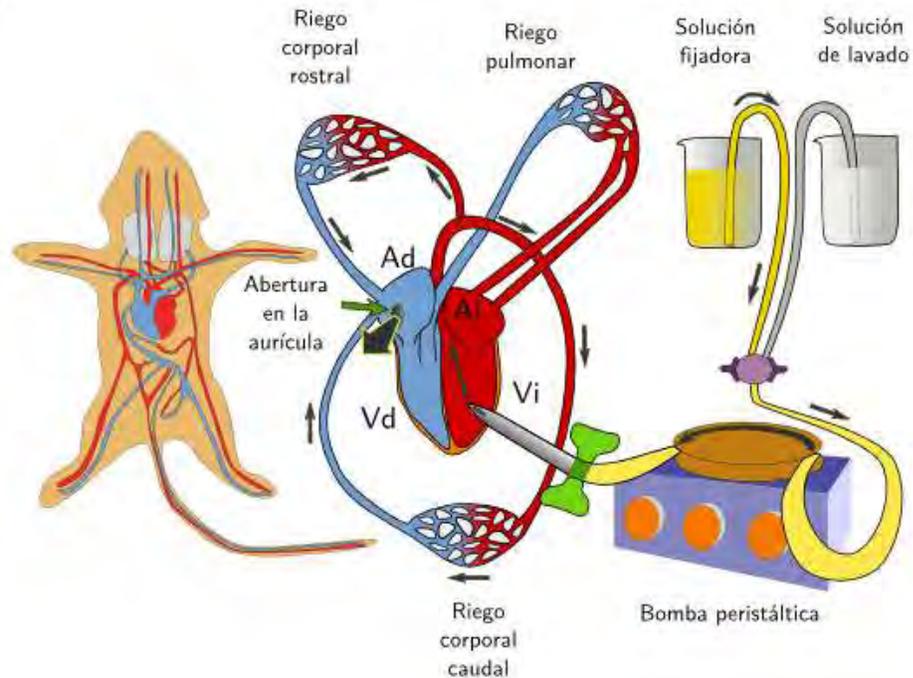


Figura. 7. Técnica de fijación por perfusión de un organismo completo. Mediante este tipo de perfusión se introduce la solución fijadora en el sistema circulatorio. La bomba peristáltica aporta la presión suficiente para permitir al fijador entrar a través del ventrículo izquierdo (Vi) y pasar a la aorta, desde la cual se distribuye por todo el cuerpo (excepto por el circuito pulmonar). Tras pasar por la red capilar la solución fijadora pasa a los vasos venosos que terminan por verter su contenido en la aurícula derecha (Ad). A esta cavidad hay que hacerle una abertura para que la solución fijadora, una vez realizada su función, salga del circuito. Ai: aurícula izquierda; Vd: ventrículo derecho. Atlas de histología vegetal y animal, métodos de fijación, 2015.

RESULTADOS

Los valores de la presión arterial de los 4 ciclos estrales se obtuvieron de 9 ratas WKY y 10 ratas SHR. En cada una de estas ratas, se realizaron 4 mediciones de PA en cada una de las etapas del ciclo estral, y los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism.

En el caso de las ratas WKY (control normotenso) las mediciones muestran que los valores de la presión sistólica y diastólica durante las 4 etapas del ciclo estral están dentro del rango de presión arterial normal (120-129/80-84 mm Hg) (Shumei, *et al.* 2015) mientras que la frecuencia cardiaca es menor en la etapa del estro en comparación con el diestro (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica y diastólica en ratas WKY.

	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO	DIESTRO
FRECUENCIA CARDIACA (LATIDOS/MIN)	407.6±5.44	393.5±4.79*	409.2±5.63	415.9±6.12 *
PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (MM HG)	120.4±1.48	117.5±1.68**	120.9±1.31	123.4±1.53**
PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (MM HG)	83.38±1.66	81.18±1.45	81.76±1.08	85.73±1.38

Valores del promedio ± SE. Se observan diferencias significativas en la frecuencia cardiaca entre la etapa del estro y el diestro. ANOVA con prueba de Tukey (*, **p ≤0.05) N=144.

En el caso de las ratas SHR, los valores mostraron que la presión arterial sistólica y diastólica están arriba del valor considerado como normal, lo que indica que son valores relacionados a hipertensión arterial (150-159/90-99 mm Hg) (Shumei, *et al.* 2015), y la frecuencia cardiaca no varía de manera significativa durante todas las etapas del ciclo estral comparando con la cepa normotensa (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica y diastólica en ratas SHR.

	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO	DIESTRO
FRECUENCIA CARDIACA (LATIDOS/MIN)	503.3±2.22	499.3±2.07	502.5±3.04	500.1±2.88
PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (MM HG)	149.4.4±1.38	151.8±1.47	151.9±1.38	151.8±1.3
PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (MM HG)	112.2±1.46	113.1±1.54	113±1.77	111.4±1.42

Valores del promedio ± SE. No se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros durante las diferentes fases del ciclo estral. ANOVA con prueba de Tukey ($p > 0.05$) N=160.

De manera más evidente, se observan las diferencias en la presión arterial sistólica en las 4 etapas del ciclo estral de las cepas WKY y SHR en la Figura 8, siendo notorio que los valores son mayores en las ratas SHR en todas las etapas del ciclo estral.

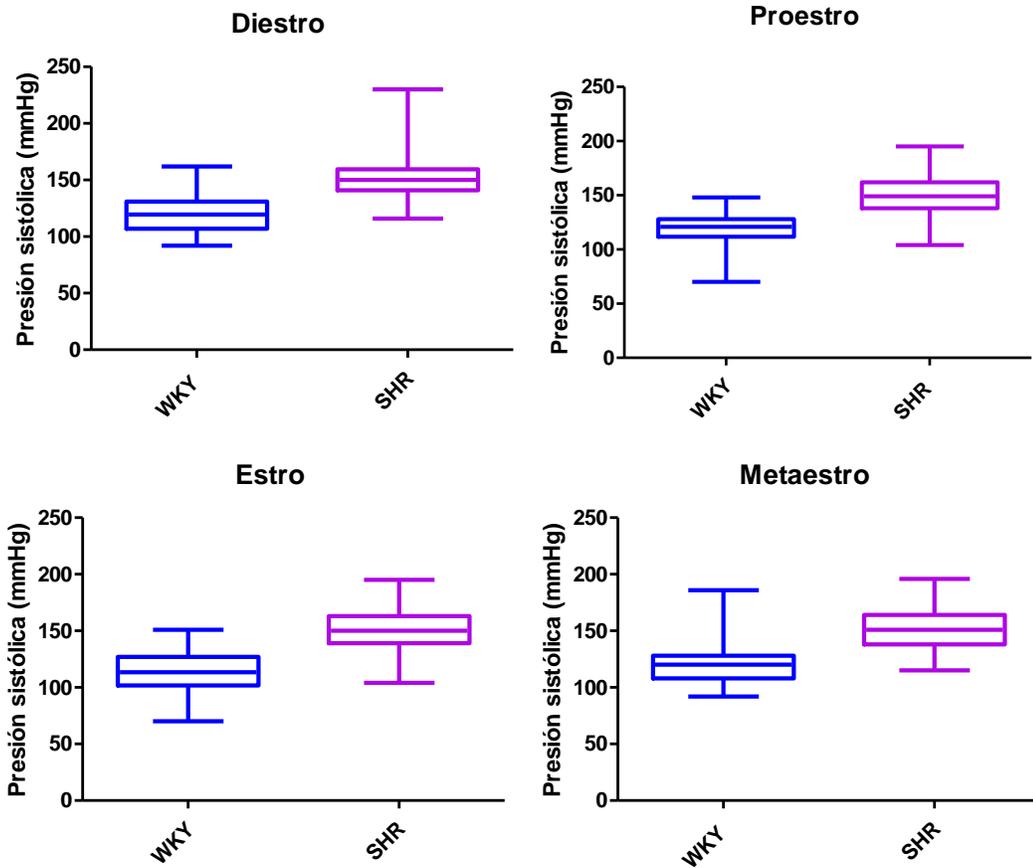


Figura 8. Comparación de la presión arterial sistólica en cada etapa del ciclo estral de las ratas WKY y SHR. Gráfica de prueba de t-student de las diferentes etapas del ciclo estral, comparando la cepa WKY vs SHR. Se observan diferencias significativas en el valor de la PA ($p < 0.0001$)

Un parámetro cardiovascular muy importante que medimos fue la Presión Arterial Media (PAM) (Tabla 3 y 4), el cual es calculado con los valores de presión arterial sistólica y diastólica, por lo tanto, la PAM es una medición más recomendable para evaluar la hipertensión (Acotzil-Vidal, *et al.* 2010). Se determina mediante la siguiente ecuación: $MP = DP + 0.33 (SP - DP)$

MP: Presión Arterial Media. SP: Presión Sistólica DP: Presión Diastólica

Los valores menores a 110 mmHg nos indican un rango de presión arterial media normal, mientras que valores mayores indican hipertensión. (Acotzil-Vidal et al., 2010).

Tabla 3. Valores de presión arterial media en ratas WKY.

	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO	DIESTRO
PRESIÓN ARTERIAL MEDIA WKY (MM HG)	94.54±1.30	90.60.94±1.22*	94.79±1.01	97.94±1.30*

Valores del promedio ± SE. Se muestran diferencias significativas entre la etapa del Estro y Diestro. ANOVA con prueba de Tukey (* p≤ 0.01) N=144.

Tabla 4. Valores de presión arterial media en ratas SHR.

	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO	DIESTRO
PRESIÓN ARTERIAL MEDIA SHR (MM HG)	124.5±1.27	126.2±1.38	126.5±1.58	125±1.20

Valores del promedio ± SE. No se observan diferencias significativas entre ninguna etapa del ciclo estral. ANOVA con prueba de Tukey (p > 0.05) N=160.

Los valores de la PAM de las cepas WKY y SHR también se analizaron mediante la prueba de ANOVA con Tukey. Los resultados mostraron que, de manera similar a la presión arterial sistólica, las ratas normotensas (WKY) presentaron diferencias significativas solamente entre las etapas de estro y de diestro p<0.01 (Fig. 9-A), mientras que en las ratas SHR no se encontraron diferencias significativas entre ninguna etapa del ciclo estral (Fig. 9-B).

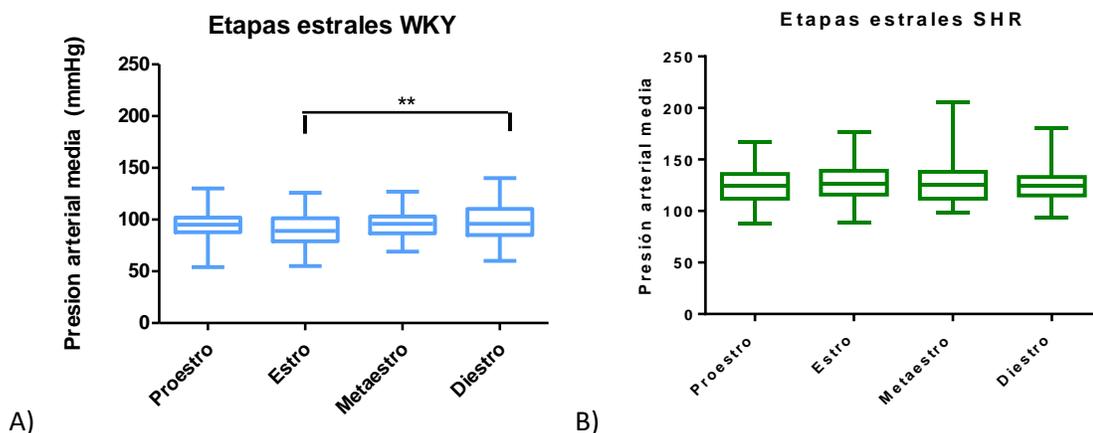


Figura 9. Diferencias en los valores de la presión arterial media en las 4 etapas del ciclo estral de las ratas WKY y SHR. **A)** Gráfica de prueba de ANOVA con Tukey de las diferentes etapas del ciclo estral obtenidas de 9 ratas WKY. Se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las etapas del estro y el diestro. **B)** Gráfica de prueba de ANOVA con Tukey de las diferentes etapas del ciclo estral obtenidas de 10 ratas SHR. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre las diferentes etapas del ciclo estral.

Histopatología

Los resultados histopatológicos fueron emitidos mediante un reporte realizado en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Fueron analizadas las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina de aorta, corazón, glándula adrenal, hígado y riñón de las ratas: SHR No. 4336 (2 meses de edad), SHR No. 2751 y WKY No. 3815 (ambas de 9 meses de edad).

SHR 4336

Hígado: Se observaron discretos focos de linfocitos y precursores hematopoyéticos distribuidos preferentemente en las zonas periportales.

Aorta: El tejido conectivo que rodea la adventicia de la aorta se apreció separado por espacios claros (consistente edema).

No se observaron cambios histomorfológicos relevantes en el resto de los órganos.

SHR 2751

Hígado: Mostró discretos focos de linfocitos y precursores hematopoyéticos distribuidos preferentemente en las zonas periportales.

Aorta: El tejido conectivo que rodea la adventicia de la aorta se apreció separado por espacios claros (consistente edema).

Riñón: Mostró que el espacio de filtración se encontró ligeramente aumentado de tamaño (Figura 14B).

No se observaron cambios histomorfológicos relevantes en el resto de los órganos.

WKY 3815

Hígado: Exhibió discretos focos de linfocitos y precursores hematopoyéticos distribuidos preferentemente en las zonas periportales.

Aorta: El tejido conectivo que rodea la adventicia de la aorta se apreció separado por espacios claros (consistente edema).

No se observaron cambios histomorfológicos relevantes en el resto de los órganos.

Adicionalmente, se realizaron 5 medidas en las tres capas de la aorta de cada rata utilizando el programa LAS EZ®, en donde se obtuvieron los siguientes valores.

ID Rata	SHR 4336	SHR 2751	WKY 3815
Medida 1 (μm)	149,66	123,87	143
Medida 2 (μm)	166,48	156,05	130,58
Medida 3 (μm)	199,49	205,7	113,88
Medida 4 (μm)	120,46	173,27	139,93
Medida 5 (μm)	137,45	171,28	116
Promedio (μm)	154,708	166,034	128,678

COMENTARIO: No se observaron cambios relevantes en los órganos evaluados entre las diferentes ratas. La diferencia en el grosor de la aorta debe ser tomada con cautela ya que sólo se cuenta con un ejemplar por grupo, además de que no se puede asegurar que la zona muestreada haya sido la misma para todos los casos.

Cortes histológicos de arteria aorta

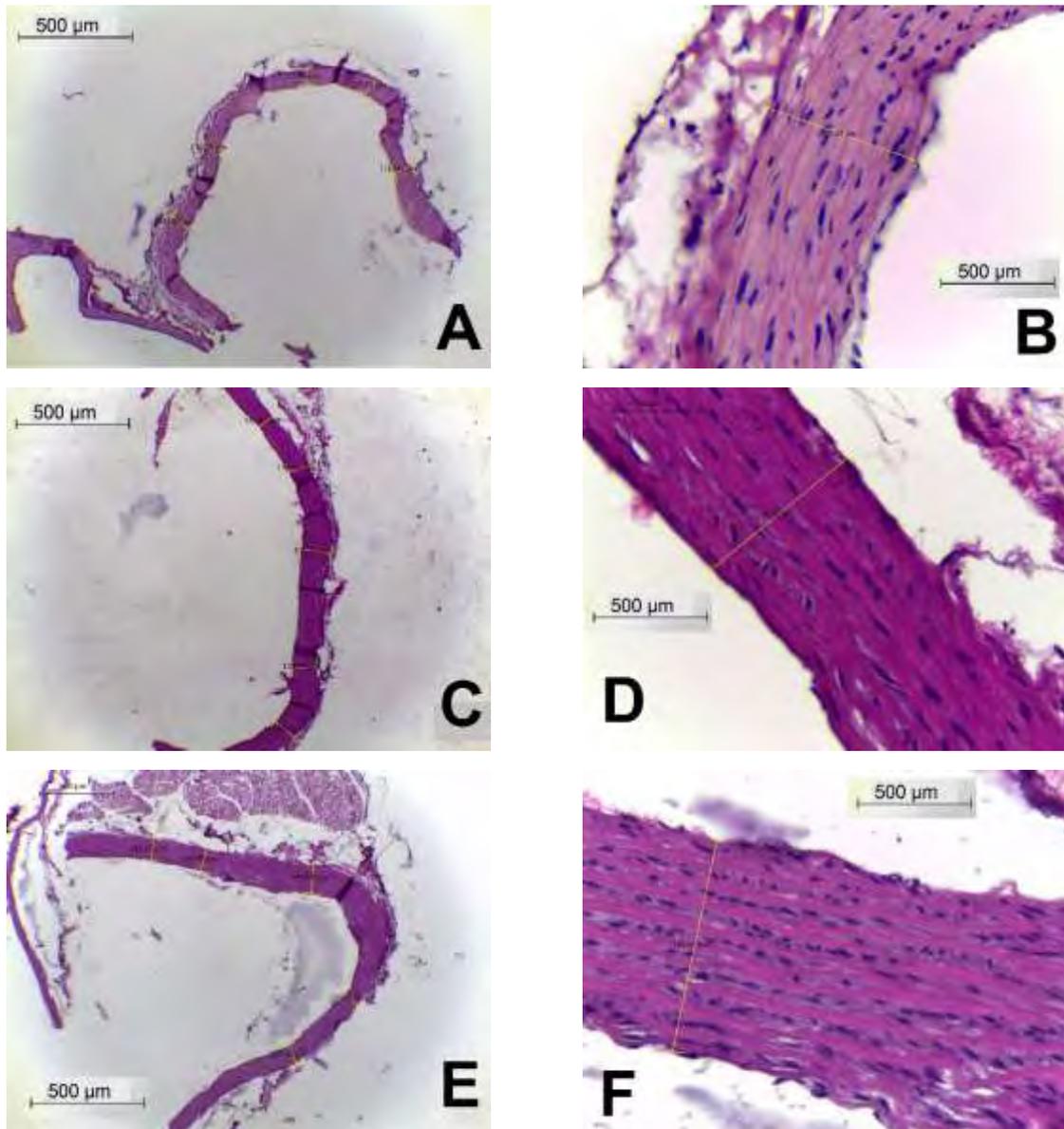


Figura 10. **A)** Fotomicrografía de aorta de rata 3815WKY. 40X. Tinción H&E. **B)** Fotomicrografía de aorta de rata 3815WKY. 400X. **C)** Fotomicrografía de aorta de rata SHR2751. 40X. **D)** Fotomicrografía de aorta de rata SHR2751. 400X. **E)** Fotomicrografía de aorta de rata SHR4336. 40X. **F)** Fotomicrografía de aorta de rata SHR4336. 400X.

Cortes histológicos de corazón

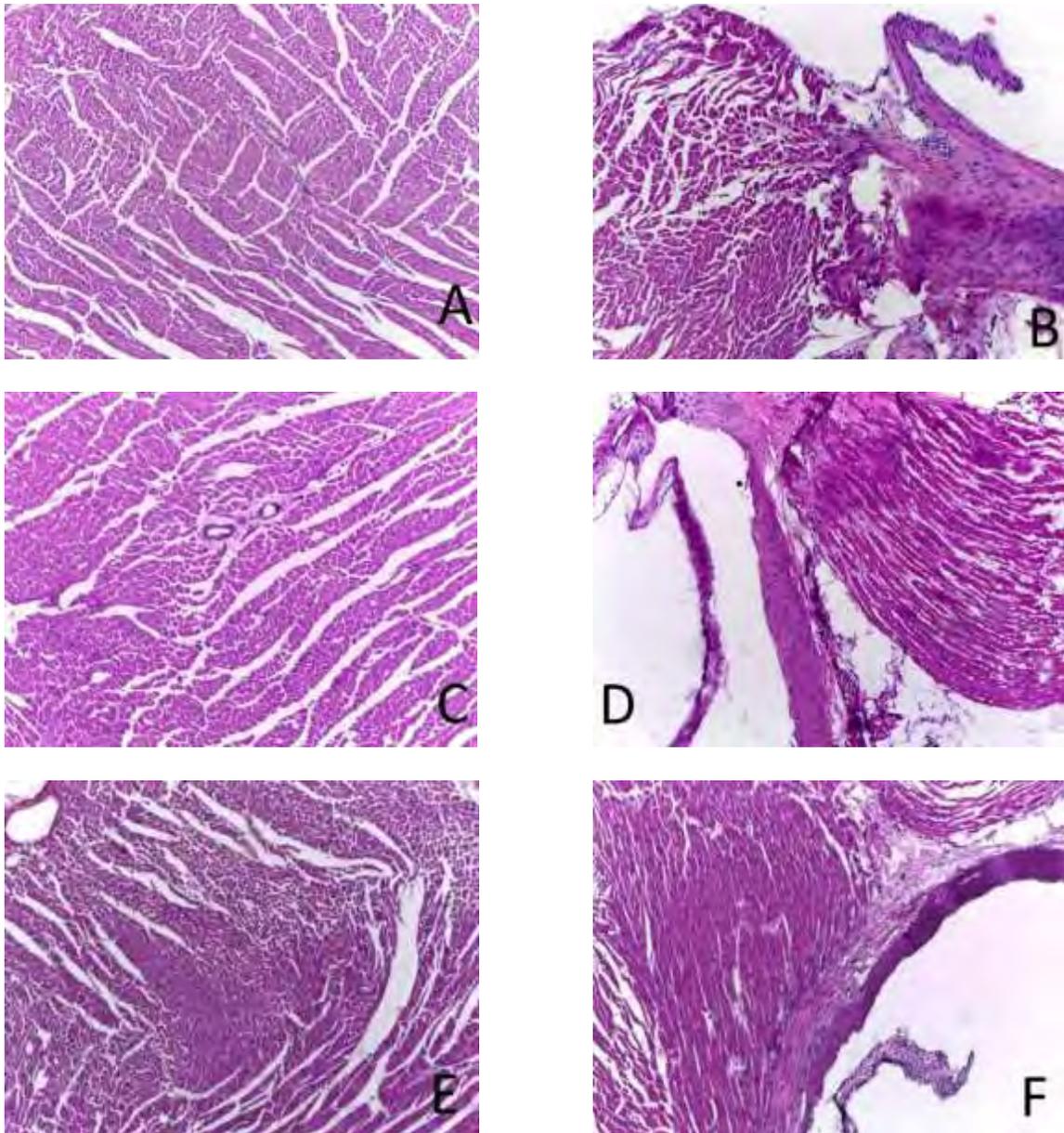


Figura 11. **A)** Fotomicrografía de corazón de rata. WKY 3815. 100X. Tinción H&E. **B)** Fotomicrografía de corazón de rata. 100X WKY 3815. **C)** Fotomicrografía de corazón de rata. SHR 2751. 100X. **D)** Fotomicrografía de corazón de rata. SHR 2751. 100X. **E)** Fotomicrografía de corazón de rata SHR 4336. 100X. **F)** Fotomicrografía de corazón de rata SHR 4336. 100X. Se observan los cardiomiocitos ventriculares (A, C y E) y auriculares (B, D y E), sin alteraciones.

Cortes histológicos de hígado

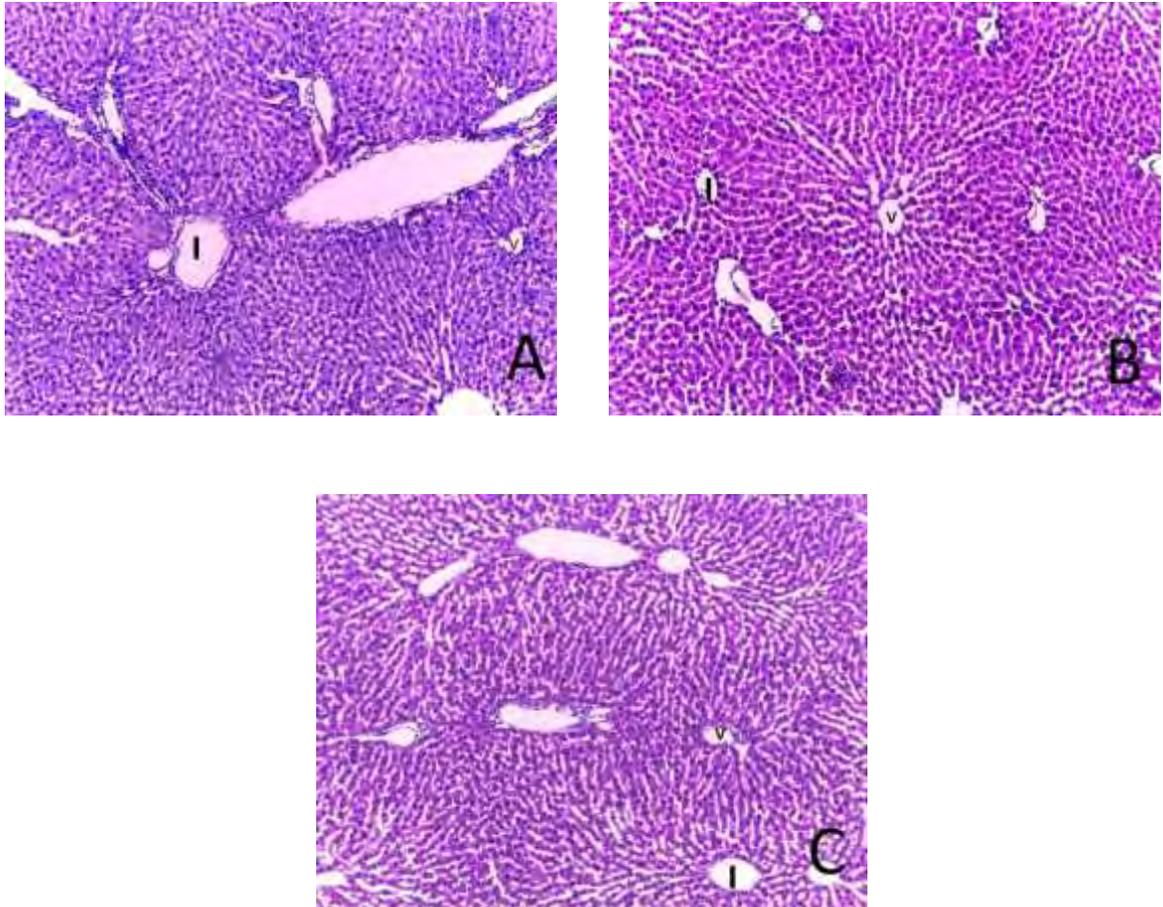


Figura 12. **A)** Fotomicrografía de hígado de rata WKY 3815.100X. Tinción H&E. **B)** Fotomicrografía de hígado de rata SHR 2751.100X **C)** Fotomicrografía de hígado de rata SHR 4336.100X. En las tres imágenes se observa la organización en cordones con disposición radial alrededor de la vena centrolobulillar (V) y los espacios porta (I)

Cortes histológicos de riñón

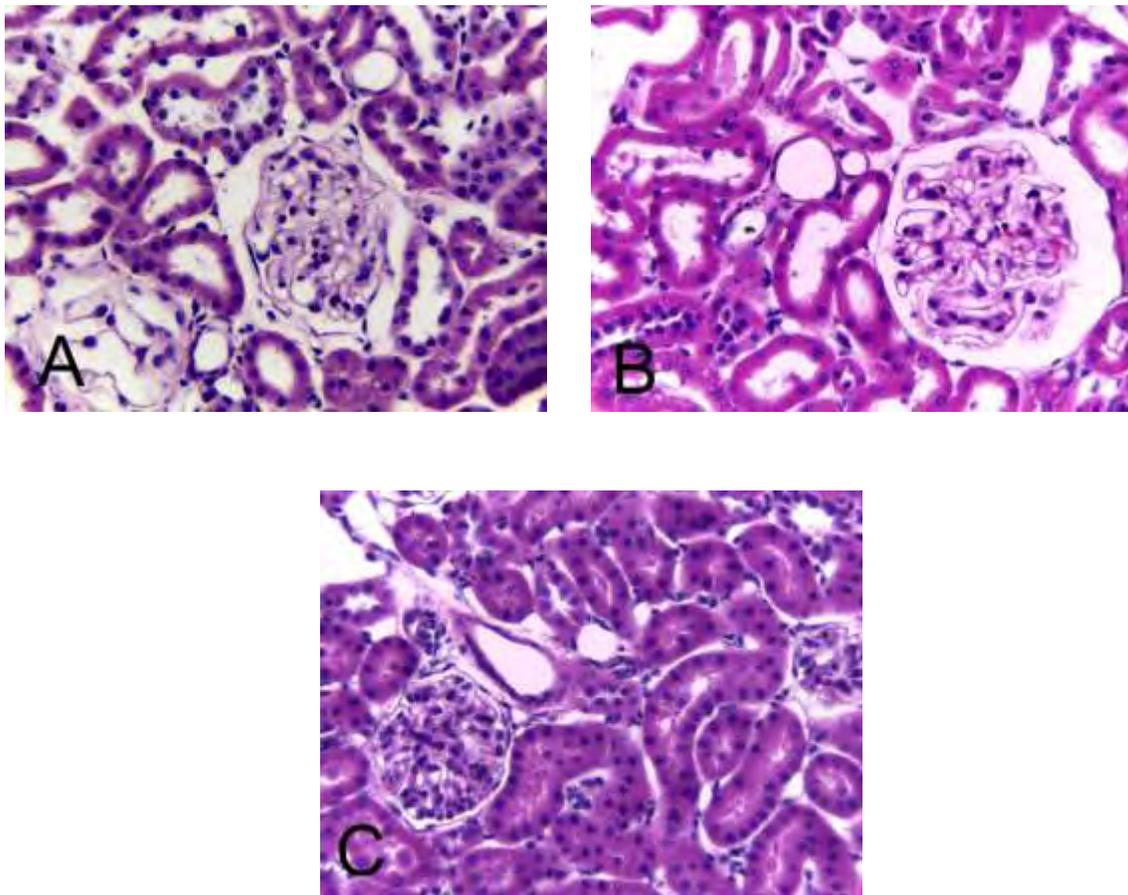


Figura 13. **A)** Fotomicrografía de riñón de rata. WKY 3815. 200X. Se observa el glomérulo renal, constituido por la cápsula glomerular y el ovillo capilar. También se aprecia el túbulo contorneado proximal y túbulo contorneado distal. Tinción H&E. **B)** Fotomicrografía de riñón de rata SHR 2751. 200X. Se observa el espacio de filtración ligeramente aumentado de tamaño, el glomérulo renal, constituido por la cápsula glomerular y el ovillo capilar. Túbulo contorneado proximal y túbulo contorneado distal. **C)** Fotomicrografía de riñón de rata SHR 4336. 200X. Se aprecia el glomérulo renal, constituido por la cápsula glomerular y el ovillo capilar. Túbulo contorneado proximal y túbulo contorneado distal.

Cortes histológicos de glándulas adrenales

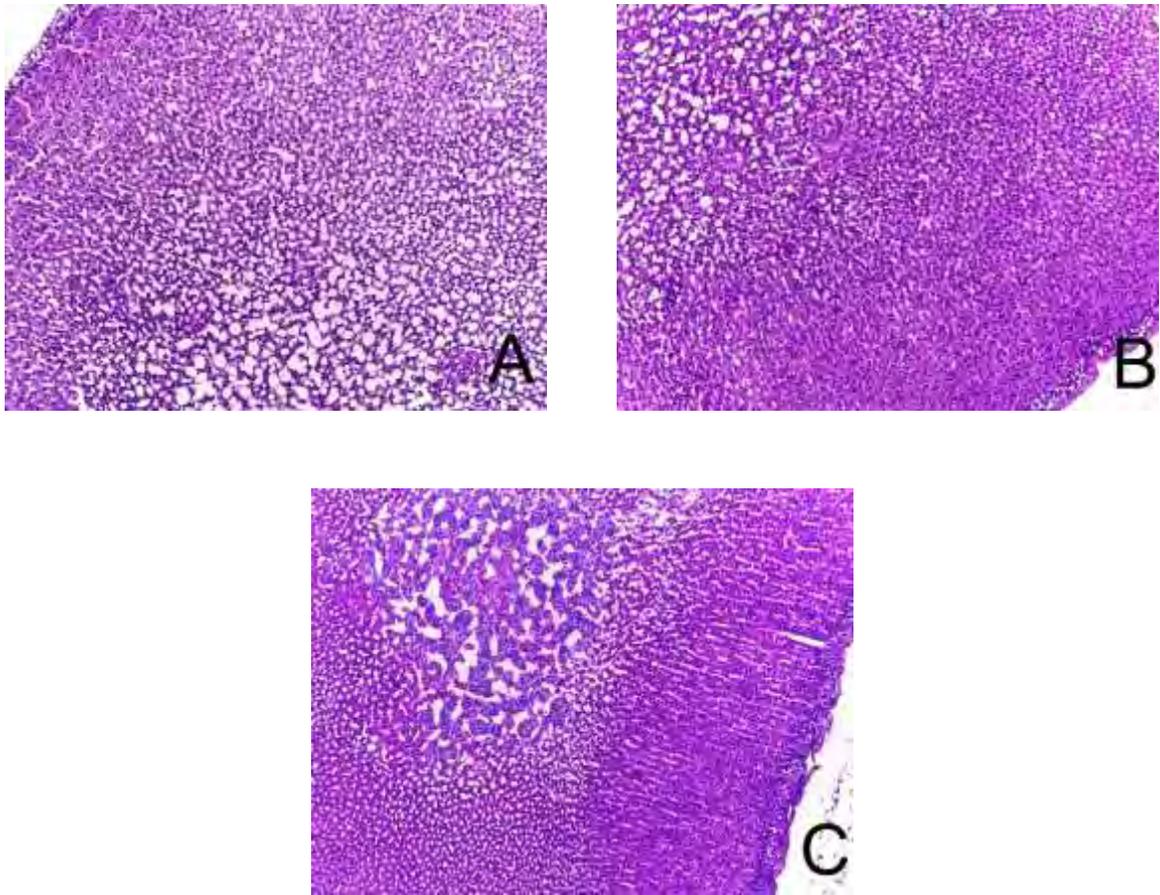


Figura 14. **A)** Fotomicrografía de glándula adrenal de rata WKY 3815. 100X. Tinción H&E. **B)** Fotomicrografía de glándula adrenal de rata SHR 2751. 100X. Tinción **C)** Fotomicrografía de glándula adrenal de rata SHR 4336. 100X. En las tres imágenes se observa la corteza con sus tres capas: glomerular, fasciculada y reticular; y la zona medular.

DISCUSIÓN

Existen estudios que han informado la posible influencia de las hormonas sexuales sobre los valores de la presión arterial en hembras y machos. Como ejemplo se ha reportado que la presión arterial media es mayor en ratas macho que en ratas hembra (Pfeffer, *et al.* 1977). Mediante la técnica clínica del monitoreo ambulatorio de la presión arterial, practicado en hombres y mujeres, se han obtenidos valores de PA que confirman que son más elevados en hombres que en las mujeres premenopáusicas en edades similares (Reckelhoff, *et al.* 2000). Lo mismo sucede con los valores de PA en los machos SHR, ya que la presión arterial media es 30 mmHg más elevada en comparación con los valores de las hembras de la misma cepa y en edades similares. En estudios realizados en ratas SHR hembras en un rango de edad similar al utilizado en el presente trabajo (12-16 semanas) se reporta una PAM de 126 mmHg, muy similar a los resultados que obtuvimos con nuestras ratas (Tabla 4) (Mitra, *et al.* 2008; Maranon, *et al.* 2013). El papel de los andrógenos es importante en el desarrollo de la hipertensión, ya que se ha reportado que la castración en machos SHR disminuye la PA en comparación con machos controles. En las hembras SHR, la ovariectomía no afecta los valores de PA; sin embargo, el tratamiento crónico con testosterona incrementa los valores de PA, lo que sugiere que los estrógenos no protegen contra la hipertensión cuando ya está establecida, pero si lo hace la falta de andrógenos (Chen, *et al.*, 1992; Reckelhoff, *et al.* 2000). Sin embargo, otros trabajos demuestran una elevación de la PA en hembras SHR ovariectomizadas, la cual disminuye significativamente con el tratamiento con 17β -estradiol, lo que sugiere que los

estrógenos tienen un papel importante en la regulación de la PA (Silva-Antonialli, *et al.* 2004).

Varios estudios apoyan la hipótesis de la existencia de un claro dimorfismo sexual en la presión arterial; ya que los niveles de presión arterial sistólica y diastólica en las mujeres normotensas o hipertensas son inferiores a la de los hombres. Estas diferencias pueden deberse en gran parte, a la influencia que tienen los andrógenos y los estrógenos sobre la regulación del sistema Renina-Angiotensina. En las ratas SHR se ha demostrado que la síntesis del ARNm del angiotensinógeno hepático y renal, así como la actividad enzimática de la renina, es mayor en machos SHR en comparación con las hembras, ambos parámetros decrecen después de una gonadectomía e incrementan con el reemplazo de testosterona en ambos sexos, lo que apoya que los andrógenos regulan la síntesis y liberación del angiotensinógeno (Chen, *et al.* 1992).

En el caso de las hembras, los estrógenos también regulan el sistema renina-angiotensina. En mujeres tratadas con terapia de reemplazo hormonal con estrógenos, se ha reportado que la enzima convertidora de angiotensina (ECA) quien convierte la angiotensina I en II, presenta una disminución de su actividad (Schunkert, *et al.* 1997).

Otros estudios demuestran que los estrógenos en las hembras SHR actúan modulando el nivel de expresión del ARNm de los receptores para angiotensina tipo II, los AT1 y AT2 en riñon, aorta y vasos mesentéricos. La expresión del receptor AT1 es elevada en machos y hembras ovariectomizadas, en comparación con hembras en etapa de estró fisiológico (Siragy, *et al.* 2009). Las hembras

ovariectomizadas tratadas con estradiol, mostraron una expresión de este receptor muy similar a la de las hembras en etapa de estro. Por otro lado, la expresión del receptor AT2 es muy evidente en las hembras en etapa de estro en comparación con los machos SHR, también la expresión del receptor está disminuida en las hembras ovariectomizadas, situación que se revierte con el tratamiento con estrógenos. Cabe mencionar que este receptor participa en la regulación de la producción del óxido nítrico renal (NO), una molécula vasodilatadora (Siragy, *et al.* 2009). También se observó que la angiotensina II adicionada a microvasos y tejido aórtico aislados, generó un efecto vasoconstrictor más potente en machos, en comparación con las hembras en etapa de estro, como ya se había reportado previamente en otros trabajos. Estos datos sugieren que los estrógenos incrementan la expresión del receptor AT2 en las hembras, (regulación a la alza) y disminuyen la expresión de los receptores AT1 (regulación a la baja) lo que pudiese explicar el menor efecto vasoconstrictor de la angiotensina II sobre la resistencia vascular en las ratas hembra SHR (Silva-Antonialli, *et al.* 2004).

El objetivo de esta tesis fue describir los cambios de la PA durante las diferentes etapas del ciclo estral en las ratas hembra SHR y WKY. Los resultados evaluados sugieren que las hormonas sexuales presentes durante el ciclo estral de las ratas WKY (normotensas), si pueden modificar significativamente los valores de PA durante las etapas de diestro y estro, en cambio las ratas SHR no mostraron diferencias significativas en los valores de PA registrados durante las diferentes etapas del ciclo estral. Durante la etapa de estro, se presentan los mayores niveles de estradiol del ciclo estral, lo que podría verse reflejado en el valor de la

media de la PAM en la etapa de estro en las ratas WKY, que es menor en comparación con las demás etapas del ciclo estral.

El hecho de que no se hayan encontrado variaciones significativas en la PA durante las diferentes etapas del ciclo estral de las ratas SHR fue inesperado. Se puede deber a que por ser genéticamente hipertensas las hormonas sexuales no afectan sus valores de PA durante el ciclo estral. Otra posibilidad es que las variaciones fisiológicas sean tan sutiles que no fue posible detectarlas con el pletismógrafo; teniendo esto en cuenta se podrían emplear métodos directos para el monitoreo de la PA en investigaciones futuras, de ser lo más conveniente.

En resumen, los resultados del presente trabajo sugieren que es importante determinar la etapa del ciclo estral de las ratas WKY cuando la investigación biomédica contemple el monitoreo de PA.

Por otra parte, estudios *in vivo* han demostrado que, en las primeras etapas de hipertensión, las ratas SHR tienen un mayor gasto cardíaco con resistencia periférica total normal. A medida que la hipertensión se establece, el gasto cardíaco vuelve a los valores normales y produce una hipertrofia en los vasos sanguíneos aumentando la resistencia periférica total. Conforme avanza la enfermedad se desarrollan progresivamente (entre los 6 y 24 meses de edad) alteraciones estructurales del corazón que están asociados con hipertrofia cardíaca congestiva (Dornas, *et al.* 2011). Es por ello que se decidió hacer un muestreo de algunos órganos blanco de la fisiopatología de la HTA de tres ratas monitoreadas.

El hallazgo más relevante se encontró en la rata SHR de nueve meses de edad que mostró un ligero incremento en el espacio de filtración del glomérulo renal, lo cual puede indicar un cambio secundario a la HTA asociado a una retracción del glomérulo por alteraciones de tipo isquémico (Nefropatología, 2016).

En el caso de las medidas registradas en las arterias aorta de las tres ratas muestreadas se observa una diferencia en el grosor. La rata que mostró un engrosamiento mayor en la pared arterial es la rata SHR adulta. Pero al evaluar cada una de las laminillas se observa que las capas íntima y media no muestran cambios significativos ocasionados por la HTA.

En el hígado de las tres ratas se hallaron precursores hematopoyéticos. Conociendo la fisiopatología de la falla cardiaca congestiva secundaria a la HTA la acumulación de sangre del lado venoso por la falla del ventrículo derecho del corazón, ocasiona que el hígado sufra un aumento de tamaño debido a la congestión venosa crónica. (Trigo, *et al.* 2011) En este trabajo es importante mencionar que solo la rata SHR de nueve meses de edad presentaba valores de HTA y que los órganos analizados indican que el daño causado por el padecimiento que presentaba aún no era tan severo. Se puede considerar que este hallazgo no tiene importancia para el tema estudiado.

CONCLUSIONES

La cepa de rata SHR empleada en este trabajo es un modelo ideal no sólo para el estudio de la patogénesis y el tratamiento de la HTA, sino también para la prevención de sus complicaciones.

En este trabajo, observamos que la PA en las ratas SHR no muestra variaciones significativas durante las diferentes etapas del ciclo estral, por lo que no es determinante conocer en qué fase del ciclo se encuentra un individuo para obtener valores confiables de PA.

En las ratas normotensas de la cepa WKY se observan diferencias significativas en los valores de PA entre las etapas de estro y diestro, por lo que se sugiere determinar siempre la etapa del ciclo estral antes de monitorear la PA en esta cepa. Se sugiere que preferentemente se realicen los estudios deseados en las etapas de proestro y metaestro, donde en el caso de esta cepa, no se observan diferencias significativas con ninguna otra etapa del ciclo estral.

REFERENCIAS

Acoltzin-Vidal C, Rabling-Arellanos EE, Marcial-Gallegos L. 2010. Diagnóstico de la hipertensión arterial basado en el cálculo de la tensión arterial media. *Revista Mexicana de Cardiología*. 21: 99-103.

Barton M, Meyer MR. 2009. Postmenopausal hypertension: mechanisms and therapy. *Hypertension*. 54:11-18.

Bichell RE. A fix for Gender-Bias in animal research could help humans. 2016. Estados Unidos. <http://www.npr.org/sections/health-shots/2016/02/10/464697905/a-fix-for-gender-bias-in-animal-research-could-help-humans> [Consultado: 18 febrero 2016]

Borgo MV, Claudio ER, Silva FB, Romero WG, Gouvea SA, Moysés MR, Santos R.L, Almeida SA, Podratz PL, Graceli JB, Abreu GR. 2016. Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 49(1):1-9.

Chen Y-F, Naftilan AJ, Oparil S. 1992. Androgen-dependent angiotensinogen, and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension*.19:456–463.

Clayton. 2014. NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*. 509: 282-283.

Cora MC, Kooistra L, Travlos G. 2015. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle using stained Vaginal smears. *Toxicologic Pathology* 43: 776-793.

Dickhout JG, Lee R M.K. 1998. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. McMaster University, Hamilton, Ontario, Canadá. H794-H800.

Díez J, Lahera V. 2001. Hipertensión arterial (I). Aspectos fisiopatológicos. Universidad complutense. Madrid. *Clin Invest. Arteriosclerosis*, Vol. 13, Num 2.

Dornas WC, Silva ME. 2011. Animal models for the study of arterial hypertension. Department of foods school of nutrition, Ouro Preto University, Brazil. *Journal of Biosciences* 36 731-737. <http://www.ias.ac.in/jbiosci/sep2011/731.pdf> [Consulta: 21 Julio 2015].

Ellison KE, Ingelfinger JR, Pivor M, Dzau VJ. 1989. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest*. 83:1941–1945.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2012. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: importancia de mejorar el diagnóstico oportuno y el control.

Farías FE. 2003. Hipertensión arterial, hipertrofia ventricular izquierda y función ventricular. Instituto de cardiología corrientes “J.F. Cabral”.

Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts II J, Reckelhoff JF. 2003. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*; 640-645.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. 2002. Environmental enrichment reverses the effect of maternal separation on stress reactivity. *The Journal of Neuroscience* 22(18):7840-7843.

Galina C, Valencia J. 2008. Reproducción de los animales domésticos. México. Limusa. pp 59-60.

Gálvez P.B. 2007. Caracterización del tejido adiposo perivascular y su papel en la regulación de la función arterial en ratas Espontáneamente Hipertensas [tesis doctoral]. Madrid, España. Facultad de farmacia, Universidad complutense de Madrid.

Gímenez J, García PM, Bonacasa B, Carbonell LF, Quesada T, Hernández I. 2006. Effects of oestrogen treatment and angiotensin-converting enzyme inhibition on the microvasculature of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*. 91(1): 261-8.

Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. 2007. The Rodent Estrous cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res (part B)* 80:84-87.

Goldman RK, Azar AS, Mulvaney JM, Hinojosa-Laborde C, Haywood JR, Brooks LV. 2009. Baroreflex sensitivity varies during the rat estrous cycle: role of gonadal steroids. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 296: R1419-R1426.

Gonder JC, Laber K. 2007. A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR Journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 48(1):29-36.

Hernandez I, Delgado J.L, Díaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC. 2000. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279: R1599-R1605.

Iams SG, Wexler BC. 1979. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*; 94:608-616.

Krinke Georg J. 1992. The laboratory Rat. *Handbook of experimental animals*. Estados Unidos. Academic Press.148-149.

Lucy MC. 2006. Estrus: Basic biology and improving estrous detection, *Proc. Dairy cattle reproductive conference*. 29-37.

Lund JP, Omyk P. 1995. Hemodynamic patterns of untreated hypertensive disease. En: Laragh JH., Brenner BM. *Hypertension pathophysiology diagnosis, and treatment*. Nueva York: Raven press. 323-342.

Lu J. Hao J. Du H. Xiao B. Li B. Li Y. Yang X. Cui W. 2016. Amlodipino and Atorvastatin improved hypertensive cardiac remodeling through regulation of MMPs/TIMPs in SHR rats. *Cell Physiol Biochem*. 39:47-60.

Maranon RO, Lima R, Mathbout RL, Carmo JM, Hall JE, Roman RJ, Reckelhoff JF. 2014. Postmenopausan hypertension: role of the sympathetic nervous system in an animal model. *Am J Physiol Regul Integf Comp Physiol*. 306: R248-R256.

Marín HB., Rivera Cerecedo CV., Hernández GR. 2011. Manejo Reproductivo de las colonias de Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR) y su control normotenso Wistar Kyoto (WKY) en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México [tesina de licenciatura]. Distrito Federal, México. UNAM.

McGuire PG, Twietmeyer AT. 1985. Aortic endotelial junctions in developing hypertension. *Hypertension* 7:483-490.

Megías M, Molist P, Pombal M. 2015. Atlas de histología vegetal y animal. Universidad de Vigo, España. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php> [Consulta: 25 Noviembre 2015].

Meirelles P, Leila M, Mandarim-de-Lacerda, CA. 1996. Morfología del miocardio en ratas sometidas a inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico. *Rev.chil.anat*; 14(2):147-155.

<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?!sisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=195200&indexSearch=I>
D. [Consulta: 21 Julio 2015].

Mitra A, Alvers KM, Crump EM, Rowland NE. 2009. Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296: R20-R28.

Montalvo A. César E. 2010. Técnica Histológica. UNAM. http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf [consulta: 9 octubre 2015].

Institute of laboratory animal resources commission on life sciences national research council. 1996. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Washington D.C.

Morimoto K, Kurahashi Y, Shintani-Ishida K, Kawamura N, Miyashita M, Uji M, Tan N, Yoshida K. 2004. Estrogen replacement suppresses stress-induced cardiovascular responses in ovariectomized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287: H1950-H1956.

Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. 2014. Effects of early life adverse experiences on the brain implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* 8: 166.

[NOM] Norma oficial de la federación. NOM-030-SSA-2009. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. México: DOF-Segob.

Obrist PA. 1981. Cardiovascular Psychophysiology, a perspective [ebook]. Estados Unidos.

https://books.google.com.mx/books?id=fYHZBQAAQBAJ&pg=PA121&lpg=PA121&dq=Hallback,+1975&source=bl&ots=eXX-KbWDzS&sig=PiIMQs5q6ozWH-UypD07jaXds6A&hl=es&sa=X&ved=0CC4Q6AEwBGoVChMI_YnKn5LFyAlVyJqACh2l0QWg#v=onepage&q=Hallback%2C%201975&f=false [Consulta: 28 Julio

2015].

Organización Mundial de la Salud. 2013. Información general sobre la hipertensión en el mundo: Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial.

Pamies E, Andreu, I. Vallejo Maroto y J. Carneado de la Fuente. 2003. Factores genéticos en la hipertensión arterial. Hipertensión. 20 (4): 163-170

Pfeffer MA, Pfeffer JM., Weiss K and Frohlich E. 1977. Development of SHR hypertension and cardiac hypertrophy during prolonged beta blockade. American Journal Physiology. 232:H639-H644.

Prieto GB, Velázquez PM. 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. Revista de la Facultad de Medicina. 45(6): 252-257.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. 2000. Gender differences in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the rennin-angiotensin system Hypertension. Hypertension. 35:480-483.

Rojas C, Jesilane M. 2006. Protección antihipertensiva del sistema calicreína cinicas renal en un modelo animal de sal-sensibilidad [tesis de licenciatura]. Chile. Universidad Austral de Chile.

Santmyre BR, Venkat V, Beinder E, Baylis C. 2010. Impact of the estrus cycle and reduction in estrogen levels with aromatase inhibition, on renal function and nitric oxide activity in female rats. Elsevier Steroids 75: 1011-1015.

Schunkert H, Danser AH, Hense HW. 1997 Effects of estrogen replacement therapy on the renin – angiotensin system in post-menopausal women Circulation,95:39–45.

Secretaría de Salud. 2001. Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión arterial.

Shumei M, Chengde L. 2015. Hypotensive and antiangiotensin-converting enzyme inhibitory activities of eisenia fétida extract in spontaneously hypertensive rats. Evidence-Based complementary and alternative medicine. 2015:349721.

Siragy HM. 2009. The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection. Curr Hypertens Rep. 11(4):260-2.

Silva-Antonialli MM, Tostes RCA, Fernandes L, Fior-Chadi DR, Hiromi A, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D. 2004. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than male spontaneously hypertensive rats. Cardiovascular research, Elsevier. 62: 587-593.

Trigo Tavera FJ. 2011. Patología sistémica veterinaria. Quinta edición. McGraw-Hill.

Van Den Buuse M. 1994. Circadian Rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in Spontaneously Hypertensive Rats as measured with radio-telemetry. *Physiology & Behavior* 55(4): 783-787.

Van V BN, Chafe LL, Antic V, Schnyder-Candrian, Pierre MJ. 2000. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44:361-373.

Wagner-Grau P. 2010. Fisiopatología de la hipertensión arterial. *An Fac Med* 71(4): 225-9.

Waynforth HB, Flecknell PA. 1992. Experimental and surgical technique in the rat. Second edition. Elsevier. pp. 275.

White BA. The Endocrine and Reproductive Systems. In Berne and Levy, *Physiology*, eds. Bruce M. Koeppen and Bruce A. Stanton. (Mosby Elsevier, 2010) p.706-724.

William O. Reece. 2009. *Dukes Fisiología de los animales domésticos*. 12° ed. Estados Unidos. Acribia S.A. pp. 801-804.

Xu X, Xiao JC, Luo L.F, Wang S, Zhang JP, Huang JJ. 2008. Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endotelial ultrastructure. *Int J Cardiol*. 130:196-204.