



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**REGULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DE LA  
AORTA POR LAS SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO Y  
DE LA CICLOOXIGENASAS EN RATAS  
HIPERTENSAS**

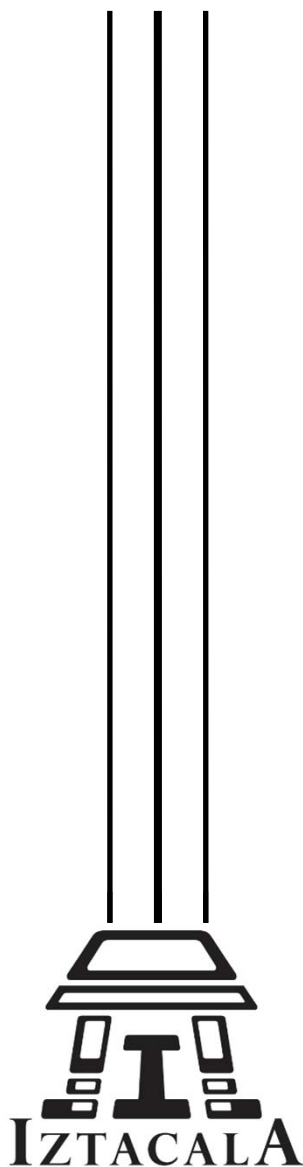
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ANGÉLICA CANTERO TÉLLEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS  
2017**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



# LICENCIATURA EN **B**IOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 3 de Farmacología Cardiovascular, de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, con la dirección del Dr. Maximiliano Ibarra Barajas y el apoyo de la Dra. Patricia Castro Moreno. Dicho proyecto de investigación estuvo financiado por el programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, DGAPA UNAM (IN221615) y por el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera FESI-DIP-PAPCA-2014-37 FES-Iztacala UNAM.



## *Agradecimientos*

Agradezco de una manera muy especial al **Dr. Maximiliano Ibarra Barajas** por la orientación en el desarrollo de este proyecto, así como las facilidades dadas en su laboratorio; por todo el apoyo y confianza que se me otorgo, así como por la formación y preparación académica. Gracias por ser mi verdadero “Papá académico”

De igual manera agradezco especialmente a la **Dra. Patricia Castro Moreno** por todo el apoyo y confianza brindada, así como por alentarme día a día a alcanzar una meta más en mi vida.

Gracias por tu orientación, enseñanzas y sobre todo gran amistad. Gracias por invertir tiempo de tu vida para no permitir que me rindiera, eres de los mejores ejemplos que tengo.

Agradezco a los sinodales **Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**, **Dra. Leticia Moreno Fierros** y a la **Dr. Ana Lilia García Hernández** por la orientación que me fue otorgada durante la realización de mi tesis de licenciatura.

Agradezco a mi padre **Juan Antonio Cantero Quezada** por todo el amor, paciencia y apoyo incondicional que me ha dado; ninguna universidad podrá enseñarme lo que tú me has enseñado de la vida. Tú siempre fuiste, eres y serás el mejor ejemplo a seguir.

De igual manera agradezco a mi madre **María del Carmen Téllez García** por todos los años entregados a mi persona, gracias a la educación y tiempo que me dedicaste soy la mujer que soy en día. Tú me enseñaste que no importa que tan difícil sea la vida, siempre hay tiempo para ser feliz.

Con mucho amor agradezco a mi hermana **Elizabeth Alicia Cantero Téllez**, por ser la constante que es en mi vida, por todos los regaños y llamados de atención impartidos, pero sobre todo por todas las alegrías que hemos compartido. Por ser mi alma gemela...Gracias por no dejar de creer en mí.

De manera singular agradezco a mi prima **Eva Viviana Urrutia Cantero** por enseñarme que este es el único camino hacia la verdadera libertad.

Agradezco a mis amigos: **Yumara Martínez Yllescas, Ricardo Zamora Orozco, Max Escamilla Hernández, Luz Ávila Vázquez, Sandra Guía Ramírez, Joali Acuña Muñoz, Yadira López Alvarado y Antonio Jiménez Santos**; por haber compartido todo este tiempo conmigo y hacérmelo mucho más ameno y divertido.

*Finalmente, a mi esposo Ángel Jiménez Chávez, simplemente no hay palabras suficientes con las que te pueda agradecer por todo lo que has hecho por mí...tú le das la dirección correcta a mi vida.*

*Eres el mejor regalo que me pudo dar la universidad...y que esto sea solo una de las primeras metas que logramos juntos para poder cumplir nuestros sueños... Te amo, Gracias.*



## *Dedicatorias*

*A mi pequeña Abril Ayla Rosaldo Cantero, porque tú eres el mejor ejemplo de lo fuerte, valiente y feliz que se puede ser en la vida.*



## ÍNDICE

### ÍNDICE DE FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

### ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
<b>1.0 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 Vasos sanguíneos.....	5
1.2 Tono vascular.....	6
1.3 Regulación del tono vascular.....	6
1.3.1 Óxido nítrico.....	7
1.3.2 Sintetasas de óxido Nítrico (NOSs).....	9
1.3.2.1 Sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS).....	10
1.3.2.2 Sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS).....	11
1.3.2.3 Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).....	11
1.3.3 Ciclooxygenasas (COXs).....	11
1.3.3.1 Ciclooxygenasa 1 (COX-1).....	14
1.3.3.2 Ciclooxygenasa 2 (COX-2).....	14
1.4 Hipertensión arterial.....	15
<b>2.0 ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
<b>3.0 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>4.0 HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>5.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>6.0 MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
6.1 Reactivos.....	22
6.2 Animales.....	22
6.3 Medición de presión arterial sistólica.....	22
6.4 Inducción de hipertensión arterial secundaria.....	23
6.5 Obtención de arteria aorta torácica.....	23
6.6 Inhibición de la NOSs y COXs <i>en órgano aislado</i> .....	24

6.7 Registro de contracción isométrica.....	24
6.8 Análisis de resultados.....	26
<b>7.0 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
7.1 Efecto de L-NAME en la presión arterial sistólica de ratas Wistar.....	27
7.2 Curva concentración-respuesta a fenilefrina de anillos de aorta: comparación entre ratas normotensas e hipertensas.....	28
7.3 Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta: efecto de la inhibición de las enzimas sintetas de óxido nítrico y ciclooxigenasas.....	30
<b>8.0 DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>9.0 CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>10.0 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>49</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la aorta.....	- 6 –
<b>Figura 2.</b> Síntesis de óxido nítrico.....	- 8 –
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de relajación dependiente de óxido nítrico.....	- 9 –
<b>Figura 4.</b> Estructura general de las sintasas de óxido nítrico.....	- 10 –
<b>Figura 5.</b> Síntesis de prostanoïdes a partir del ácido araquidónico .....	- 12 –
<b>Figura 6.</b> Estructura de las ciclooxigenasas.....	- 13 –
<b>Figura 7.</b> Prevalencia de hipertensión arterial por edad y sexo.....	- 15 –
<b>Figura 8.</b> Cambios en la expresión proteínica de iNOS, nNOS y COX-2 en arteria femoral de ratas Zucker comparándolas con ratas Wistar.....	- 17 –
<b>Figura 9.</b> Cambios en la localización de NOSs y COXs en arteria femoral de ratas Zucker comparándolas con ratas no obesas Localización de eNOS, COX-1 y COX-2 en aorta de ratas.....	- 18 –
<b>Figura 10.</b> Cambios en la expresión proteínica de NOSs, COXs en aorta de ratas con hipertensión secundaria inducidas con L-NAME.....	- 19 –
<b>Figura 11.</b> Localización de eNOS, COX-1 y COX-2 en arteria aorta de ratas normotensas y ratas con hipertensión secundaria inducidas con L-NAME .....	- 20 –
<b>Figura 12.</b> Inhibición de las NOSs y COXs en órgano aislado .....	- 24 –
<b>Figura 13.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los inhibidores de las COXs y NOSs sobre la contracción de los anillos arteriales.....	- 25 –
<b>Figura 14.</b> Curso temporal de la presión arterial sistólica antes y después la administración de L-NAME.....	- 27 –
<b>Figura 15.</b> Efecto contráctil de la fenilefrina (agonista adrenérgico $\alpha$ 1) de anillos con (E+) y sin endotelio (E-) de aorta de ratas normotensas e hipertensas.....	- 28 –
<b>Figura 16.</b> Curvas consecutivas a fenilefrina (agonista adrenérgico $\alpha$ 1) de anillos de aorta de ratas normotensas e hipertensas.....	- 30 –

<b>Figura 17.</b> Efecto de la inhibición selectiva de la iNOS con 1400w sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta de ratas normotensas e hipertensas.....	- 31 –
<b>Figura 18.</b> Efecto de la inhibición selectiva de nNOS con n-propil-L-arginina sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta de ratas normotensas e hipertensas.....	- 32 –
<b>Figura 19.</b> Efecto de la inhibición no selectiva de la NOS con L-NAME sobre la respuesta contráctil a fenilefrina de aorta de ratas normotensas e hipertensas.....	- 33 –
<b>Figura 20.</b> Efecto de la inhibición selectiva de la COX-1 con sc-560 sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta de ratas normotensas e hipertensas .....	- 35 –
<b>Figura 21.</b> Efecto de la inhibición selectiva de COX-2 con ns-398 sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina (agonista vaso contráctil) de la aorta de ratas normotensas e hipertensas.....	- 36 -

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Concentración efectiva 50 (CE50) a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha$ 1) y la relación de concentración efectiva a 50 (Rel. de CE50) de anillos con y sin endotelio de ratas normotensas e hipertensas .....- 29 –
- Tabla 2.** Concentración efectiva 50 (CE50) a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha$ 1) y la relación de concentración efectiva 50 (Rel. de CE50) de anillos sin y con L-NAME de ratas normotensas e hipertensas..... - 34 –
- Tabla 3.** Concentración efectiva 50 (CE50) a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha$ 1) y la relación de concentración efectiva 50 (Rel. de CE50) de anillos sin y con el ns398 (inhibidor selectivo de la COX-2) de ratas normotensas e hipertensas..... - 37 -

## ABREVIATURAS

**AMPc** Adenosina monofosfato cíclico  
**Ang II** Angiotensina II  
**cGKs1** Proteínas cinasas dependientes de GMPc 1  
**CCLM** Cinasa de la cadena ligera de la miosina  
**CE50** Concentración efectiva 50  
**COXs** Ciclooxygenasas  
**COX-1** Ciclooxygenasa 1  
**COX-2** Ciclooxygenasa 2  
**ECV** Enfermedades cardiovasculares  
**EDRF** Factor relajante derivado de endotelio  
**EGF** Factor de crecimiento epidermal  
**E<sub>max</sub>** Efecto máximo  
**eNOS** Sintasa de óxido nítrico endotelial  
**FAD** Flavina adenina dinucleótido  
**FCLM** Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina  
**FMN** Flavina mononucleótido  
**GCs** Guanilato ciclasa soluble  
**GMPc** Guanosina monofosfato cíclico  
**HTA** Hipertensión arterial  
**iNOS** Sintasa de óxido nítrico inducible  
**IRAG** proteína asociada al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato  
**kDa** Kilo Daltones  
**Kg** kilogramos  
**L-NAME** N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster  
**M** Molar

**MBD** Dominio de unión a membrana  
**mg** miligramos  
**mM** Milimolar  
**mm** milímetro  
**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida  
**nNOS** Sintasa de óxido nítrico neuronal  
**NOSs** Sintasas de óxido nítrico  
**ON** Óxido nítrico  
**PAS** Presión arterial sistólica  
**PGD<sub>2</sub>** Prostaglandina D<sub>2</sub>  
**PGE<sub>2</sub>** Prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PGF<sub>2</sub>** Prostaglandina F<sub>2</sub>  
**PGG<sub>2</sub>** Prostaglandina G<sub>2</sub>  
**PGH<sub>2</sub>** Prostaglandina H<sub>2</sub>  
**PGHS** Prostaglandina endoperóxido sintasa  
**PGIs** Sintasa de prostaciclina  
**PGs** Prostanoides  
**SHR** Ratas espontáneamente hipertensas  
**SM** Síndrome metabólico  
**SRA** Sistema renina angiotensina  
**TxA<sub>2</sub>** Tromboxano A<sub>2</sub>

## RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es una de las principales causas de muerte en el mundo. Las complicaciones cardiovasculares y renales asociadas con esta enfermedad se han relacionado con cambios en la expresión y actividad de diversos sistemas enzimáticos, incluyendo a las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) y las sintasas de óxido nítrico (sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS)). Sin embargo, no existen estudios donde se analice la influencia de los metabolitos derivados de las isoformas de COXs y NOSs sobre la contracción durante la HTA. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la participación funcional de las isoformas de NOS y COX en la contracción de la aorta en un modelo de HTA inducida por inhibición de la síntesis de óxido nítrico (ON).

Para ello se utilizaron ratas Wistar machos, a las que se les indujo HTA mediante la administración oral de 75/mg/kg/día de L-NAME (inhibidor de las sintasas de ON) durante 15 días. La presión arterial sistólica (PAS) se midió antes y durante el tratamiento con L-NAME. Al finalizar el tratamiento se obtuvieron 6 anillos de ~5 mm de la aorta torácica, a 3 se les removió el endotelio y los otros 3 se dejaron intactos. Cada anillo fue colocado en una cámara de órgano aislado y se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha_1$ ). Posteriormente, para determinar la participación de cada isoforma de enzima, se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina en presencia de inhibidores selectivos para NOSs y COXs.

Los resultados muestran que en las ratas que fueron tratadas con L-NAME en el agua de bebida durante 15 días, la PAS se elevó significativamente (151 mmHg) comparadas con el grupo control (124 mmHg). La fenilefrina provocó contracción de los anillos con y sin endotelio de ratas normotensas e hipertensas. La respuesta contráctil de la aorta con endotelio de ratas hipertensas fue significativamente menor comparada con las arterias de ratas normotensas. La inhibición selectiva de nNOS y iNOS no afectó la contracción inducida por la fenilefrina en la aorta de ambos grupos de animales, mientras que el L-NAME (inhibidor no selectivo de las NOSs) aumentó significativamente la respuesta contráctil a la fenilefrina en anillos con endotelio de ratas

normotensas e hipertensas. Por otro lado, los inhibidores selectivos para COX-1 y COX-2 bloquearon la actividad contráctil a fenilefrina en anillos con endotelio de ratas normotensas e hipertensas, aunque el efecto de la COX-1 fue menor en arterias de ratas hipertensas.

Los datos indican que el ON sintetizado por la eNOS así como prostanoïdes vasoconstrictores derivados de las COX-1 y COX-2 regulan la contracción a la fenilefrina de la aorta ratas normotensas e hipertensas. Además, nuestros datos sugieren que la actividad de eNOS está aumentada mientras que la de la COX-1 esta disminuida en la aorta de ratas hipertensas con L-NAME

## SUMMARY

Hypertension (HTA) is one of the leading causes of death in the world. The cardiovascular and renal complications associated with this disease have been linked to changes in the expression and activity of various enzyme systems, including cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1 and COX-2) and nitric oxide synthases (oxide synthase Neuronal nitric oxide (nNOS), inducible (iNOS) and endothelial (eNOS)). However, there are no studies in which the influence of the metabolites derived from COX and NOS isoforms on the contraction during hypertension is analyzed. Therefore, the objective of the present study was to determine the functional involvement of NOS and COX isoforms in aortic contraction in a model of hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthesis (ON).

Male Wistar rats were given 75mg/kg/day L-NAME (inhibitor of ON synthases) by oral administration for 15 days. Systolic blood pressure (SBP) was measured before and during treatment with L-NAME. At the end of treatment 6 rings of ~ 5 mm were obtained from the thoracic aorta, 3 the endothelium was removed and the remaining 3 were left intact Each ring was placed in an isolated organ chamber and concentration-response curves were constructed for phenylephrine ( $\alpha$  1 -adrenergic agonist). Subsequently, to determine the participation of each enzyme isoform, concentration-response curves were constructed to phenylephrine in the presence of selective inhibitors for NOSs and COXs

The results shown that in rats treated with L-NAME in drinking water for 15 days, SBP rose significantly (151 mmHg) compared to the control group (124 mmHg). Phenylephrine caused contraction of the rings with and without endothelium of normotensive and hypertensive rats. The intact aorta contractile response of the hypertensive rats was significantly lower compared to the arteries of normotensive rats. The contractile response of the intact aorta of hypertensive rats was significantly lower compared to the arteries of normotensive rats. The nNOS and iNOS Selective inhibition did not affect the contraction induced by phenylephrine in the aorta of both groups of animals, whereas L-NAME (non-selective inhibitor of NOSs) significantly increased the

contractile response to phenylephrine in rings with endothelium of normotensive and hypertensive rats. On the other hand, selective inhibitors for COX-1 and COX-2 blocked the contractile activity of phenylephrine in endothelium rings of normotensive and hypertensive rats, although the effect of COX-1 was lower in arteries of hypertensive rats

The data indicate that ON synthesized by eNOS as well as vasoconstrictor prostanoids COX-1- and COX-2-derived regulate the contraction to phenylephrine in aorta from normotensive and hypertensive rats. In addition, our data suggest that eNOS activity is increased whereas that of COX-1 is decreased in the aorta of hypertensive rats with L-NAME



## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son un sistema de conductos que transportan la sangre desde el corazón hasta los tejidos y viceversa (Sandoo, Zanten et al. 2010). Debido a su función, los vasos sanguíneos se pueden dividir en venas y arterias, las venas se encargan de llevar la sangre desde los órganos hasta el corazón y las arterias cumplen la tarea inversa, ya que conducen la sangre oxigenada desde el corazón hasta los órganos del cuerpo (Guyton and Hall 2006).

El comportamiento de la pared arterial es muy complejo, la arteria aorta recibe la sangre del ventrículo izquierdo durante la contracción del corazón, dicha sangre fluye por la aorta a los órganos viscerales y a las regiones periféricas del organismo, esta arteria tiene la función principal de amortiguar las oscilaciones del pulso cardiaco y del flujo sanguíneo con el fin de nutrir de sangre oxigenada a los diferentes tejidos y órganos del cuerpo (Otero-Martínez, Otero-Pereiro et al. 2014). Para que la aorta pueda cumplir esta función necesita de un alto grado de elasticidad en la pared vascular, la cual le permite mantener una adecuada propulsión a la sangre para que circule por todo el sistema vascular (Tsamis, Krawiec et al. 2013). Así, la estructura y composición de la aorta determina sus propiedades y comportamiento funcional (Otero-Martínez, Otero-Pereiro et al. 2014).

La aorta es una arteria de conductancia y está formada por tres capas concéntricas llamadas túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (Sandoo, Zanten et al. 2010). Como se muestra en la figura 1 la túnica íntima delimita la luz vascular y está formada por una monocapa de células endoteliales. La túnica media se encuentra enseguida de la túnica íntima y está formada por capas de células de músculo liso y por tejido conjuntivo que, dependiendo del tipo de vaso, puede tener distinta cantidad de fibras. Finalmente, la túnica más externa es la adventicia, conformada por tejido conjuntivo; además la aorta presenta dos capas de fibras elásticas entre la túnica íntima y la túnica

media y entre la túnica media y la capa adventicia a las cuales se les denomina lámina elástica interna y lámina elástica externa respectivamente (Gal, López et al. 2007).

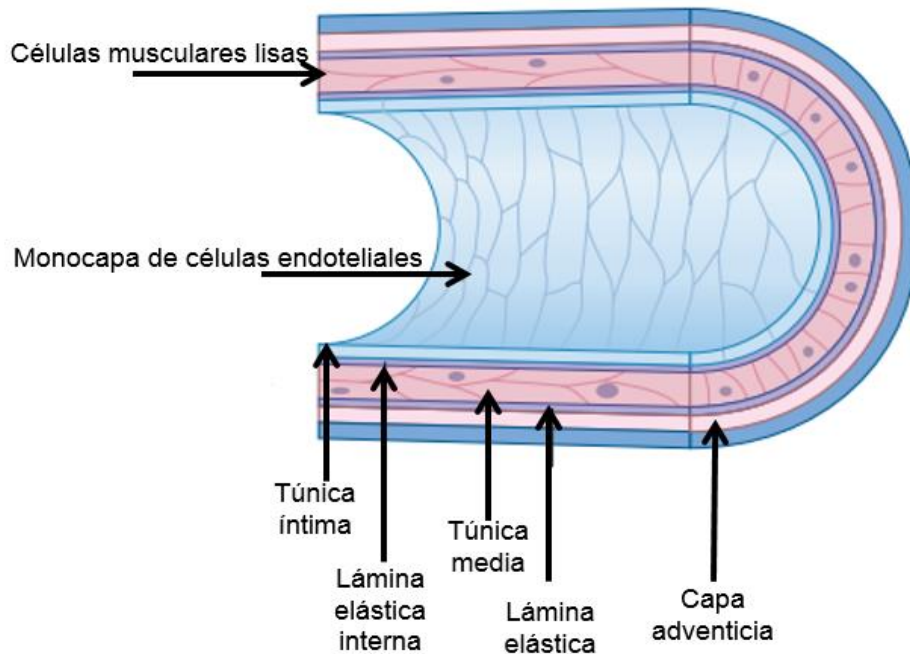


Figura 1. Estructura de la arteria aorta. Modificado de Loscalzo, et al. 2012.

## 1.2 Tono vascular

El tono vascular se define como el estado de tensión de las paredes de los vasos sanguíneos capaces de relajarse o contraerse según las necesidades fisiológicas del organismo. Para que los vasos transporten la sangre apropiadamente necesitan de un tono vascular adecuado, para regular la presión sanguínea y la distribución del flujo sanguíneo entre los tejidos y órganos del cuerpo (Jackson 2000).

## 1.3 Regulación del tono vascular

La regulación del tono vascular depende de la actividad contráctil de los vasos sanguíneos y se lleva a cabo mediante una compleja interacción de estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores, tales estímulos pueden ser hormonales, de neurotransmisores o de factores derivados del endotelio (Jackson 2000).

### 1.3.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es una pequeña molécula diatómica, gaseosa, inorgánica, sin carga, que tiene un electrón desapareado lo que lo hace un radical libre altamente reactivo, es altamente lipofílico y difusible ya que pasa a través de las membranas celulares sin gasto de energía y tiene una vida media de menos de 5 segundos (Harumi, Silva et al. 2012).

Uno de los principales factores derivados del endotelio que regulan el tono vascular es el ON el cual fue descubierto a partir de los experimentos realizados en 1980 por Furchgott y Zawadski quienes describieron que el proceso de relajación del músculo liso vascular es dependiente de endotelio. Ellos demostraron que arterias previamente contraídas relajaban en respuesta a acetilcolina, sólo si las células endoteliales se encontraban intactas, pero cuando se eliminaba el endotelio de las arterias se anulaba la vasodilatación, lo que sugería que dicho efecto estaba mediado por alguna sustancia derivada del endotelio que se le denominó factor relajante derivado de endotelio (EDRF por sus siglas en inglés) (Furchgott and Zawadzki 1980). Posteriormente, se demostró que el EDRF era el ON (Moncada, Higgs et al. 1993).

El ON tiene diversas funciones dependiendo del sitio donde sea sintetizado. En el sistema nervioso central es un neurotransmisor que permite se lleven a cabo funciones que incluyen la formación de la memoria, además contribuye al control de la agregación plaquetaria, regula funciones gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias. Es sintetizado en el endotelio vascular, siendo el principal responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos, lo que es esencial para la regulación de la presión sanguínea (Moncada, Higgs et al. 1993).

La síntesis de ON se da a partir del aminoácido L-arginina que implica dos niveles de oxidación, en el primero, el sustrato L-arginina es oxidado a N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina, y posteriormente este intermediario es oxidado a L- citrulina y ON. Esta reacción consume 1.5 moles de NADPH y 2 moles de oxígeno por cada mol de L- citrulina formada, figura 2 (Dias, Negrão et al. 2011).

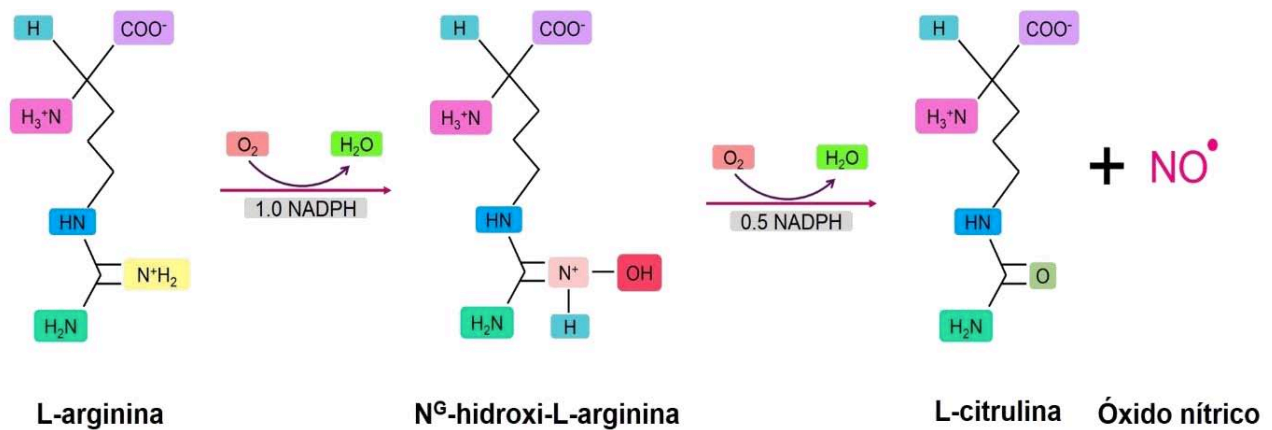


Figura 2. Síntesis de óxido nítrico. Modificado de (Habib and Ali 2011).

El ON producido sale de las células endoteliales por difusión pasiva y del mismo modo entra a las células del músculo liso de los vasos sanguíneos; donde se une a la guanilato ciclasa soluble (GCs) promoviendo con esto la síntesis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosina trifosfato (GTP) (Geiselhöringer, Werner et al. 2004, Guyton and Hall 2006, Hofmann, Schmidt et al. 2009, Zhao, Vanhoutte et al. 2013).

El GMPc se une a diferentes proteínas reguladoras entre las que se incluyen fosfodiesterasas, canales iónicos o proteínas cinasas dependientes de GMPc que regulan funciones fisiológicas, como la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la vasodilatación, esta última se lleva a cabo cuando el GMPc activa a proteínas cinasas dependientes de GMPc tipo I (cGKs1 por sus siglas en ingles), estas proteínas generan relajación de las células musculares por dos mecanismos. El primero cuando fosforila a la proteína asociada al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato 1 (IRAG) lo que bloquea el canal de calcio ( $Ca^{+}$ ) activado por IP3 en el retículo sarcoplásmico, lo que ocasiona una disminución de la concentración de  $Ca^{+}$  intracelular, y por tanto no se activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina (CCLM) impidiendo que ocurra el mecanismo de

contracción de las células musculares lisas. El segundo mecanismo ocurre cuando las cGKs1 activan a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (FCLM), la cual desfosforila a la cadena ligera de la miosina impidiendo que se contraiga el musculo liso y permitiendo que se lleve a cabo la relajación lo que finalizará en el incremento del flujo sanguíneo, figura 3 (Geiselhöringer, Werner et al. 2004, Guyton and Hall 2006, Hofmann, Schmidt et al. 2009, Zhao, Vanhoutte et al. 2013).

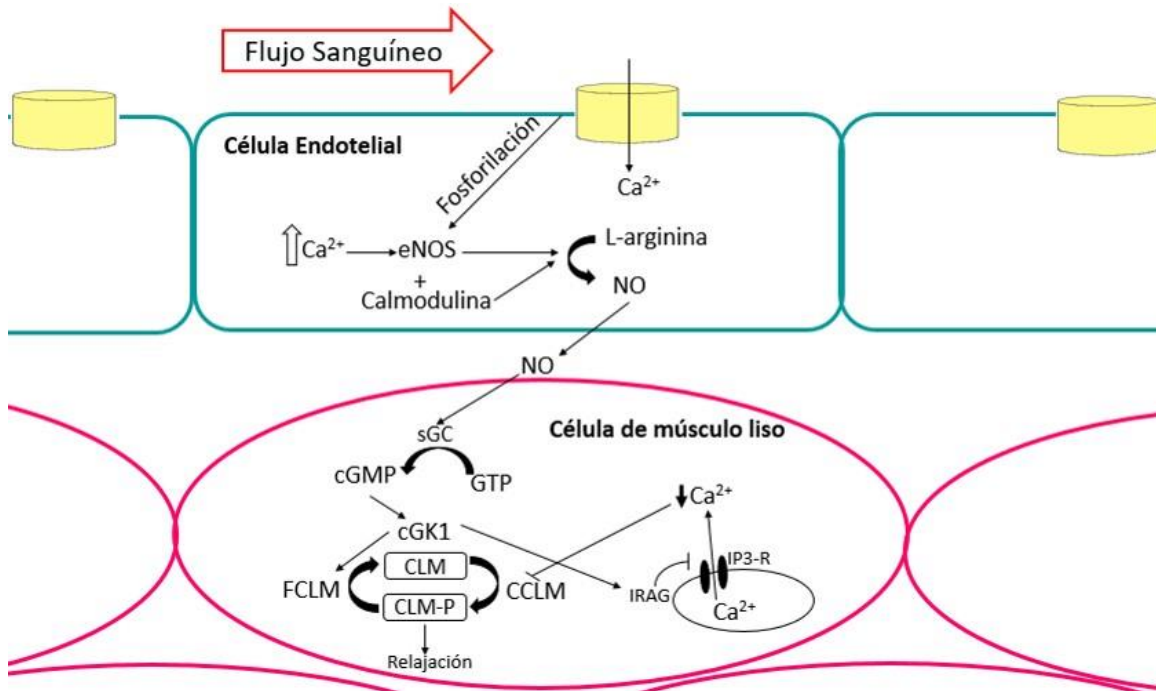


Figura 3. Mecanismo de relajación dependiente de óxido nítrico. NO=óxido nítrico, sGC=guanilato ciclasa soluble, GTP=guanosina trifosfato, eNOS=sintasa de óxido nítrico endotelial, cGK1=proteínas cinasas dependiente de GMP, CLM= cadena ligera de la miosina, CLM-P=cadena ligera de la miosina fosforilada, FCLM=fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, CCLM=cinasa de la cadena ligera de la miosina. Modificado de (Hofmann, Schmidt et al. 2009, Sandoo, Zanten et al. 2010).

La síntesis del óxido nítrico es catalizada por tres diferentes isoformas de la enzima sintasa de óxido nítrico: NOS1 o sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), NOS2 o sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y NOS3 o sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Habib and Ali 2011).

Cada isoforma es producto de diferentes genes y comparten de 50% a 60% de homología en la secuencia de aminoácidos que las componen. Estas isoformas están

constituidas por un heterodímero, que, estructural y funcionalmente puede ser dividido en dos dominios principales: el dominio C-terminal reductasa que contiene sitios de unión para nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenina dinucleótido (FAD); y el dominio N-terminal oxigenasa, que atrae un electrón del sustrato L-arginina para realizar la síntesis del óxido nítrico, figura 4 (Dias, Negrão et al. 2011).

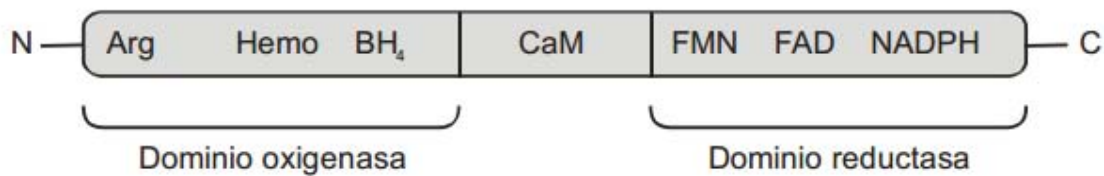


Figura 4. Estructura general de las sintasas de óxido nítrico. Modificado de (Harumi, Silva et al. 2012).

### 1.3.2.1 Sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS)

La sintasa de óxido nítrico neuronal tiene un peso molecular de 150 a 160 kDa (Sosa-Luna, Astudillo-de la Vega et al. 2005) y se encuentra en el cromosoma 12, es conservado en chimpancé, perro, vaca, rata, pollo, pez cebra, mosca de la fruta, mosquito y rana (Sayers, Barrett et al. 2009) Se expresa constitutivamente en células epiteliales, y en terminales postsinápticas de neuronas. Su activación depende del aumento intracelular de calcio (Ca<sup>2+</sup>), el cual puede ser mediante la despolarización de la membrana que lleva a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (Habib and Ali 2011).

### 1.3.2.2. Sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS)

La sintasa de óxido nítrico inducible tiene un peso molecular de 125 a 135 kDa (Sosa-Luna, Astudillo-de la Vega et al. 2005), su localización cromosómica está en el brazo largo del cromosoma 17 y es conservado en chimpancé, perro, vaca, ratón, rata, pollo, pez cebra y rana (Sayers, Barrett et al. 2009). Como su nombre lo indica se

expresa bajo inducción de ciertos estímulos, como los inflamatorios, por la presencia de citocinas o lipopolisacáridos, esta isoforma no es dependiente de calcio, ya que forma un complejo de unión a calmodulina con concentraciones muy bajas de calcio. iNOS es expresada principalmente en macrófagos y en menor medida puede ser inducida en células de la glía, hígado y músculo cardíaco (Habib and Ali 2011).

### **1.3.2.3 Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)**

Esta isoforma tiene un peso molecular de 133 kDa (Sosa-Luna, Astudillo-de la Vega et al. 2005), su localización cromosómica está en el brazo largo del cromosoma 7. Es conservado en chimpancé, perro, vaca, ratón, rata y rana (Sayers, Barrett et al. 2009). Se expresa constitutivamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y al igual que nNOS es dependiente de calcio ya que para que se forme el complejo de unión a calmodulina se necesita un aumento de calcio (Habib and Ali 2011).

### **1.3.3 Ciclooxygenasas**

Los primeros factores vaso activos derivados de endotelio que fueron identificados fueron los prostanoídes (PGs) (Félétou, Huang et al. 2011), los cuales están conformados por la prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y por el tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), todos modulan el tono vascular tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Smith, Urade et al. 2012).

Los diferentes PGs son sintetizados por las isoformas de la enzima prostaglandina endoperóxido sintasa 1 y 2 (PGHS 1 y 2) o también llamadas ciclooxygenasas (COXs) 1 y 2 (COX-1 y COX-2) (Smith, Urade et al. 2012).

La síntesis de prostanoídes a partir del ácido araquidónico se inicia cuando la fosfolipasa A hidroliza a los fosfolípidos de las membranas celulares generando ácido araquidónico, el cual, es convertido en prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) por medio de la actividad enzimática de las ciclooxygenasas que insertan dos moléculas de oxígeno a la cadena principal del ácido araquidónico. Posteriormente, las COXs, realizan una

reacción de peroxidación de la PGG<sub>2</sub> convirtiéndola en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) y agua. Finalmente, la PGH<sub>2</sub> se convierte en PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> y TxA<sub>2</sub> mediante la catálisis de enzimas específicas para cada uno de los prostanoides, figura 5 (Smith, DeWitt et al. 2000, Smith, Urade et al. 2012).

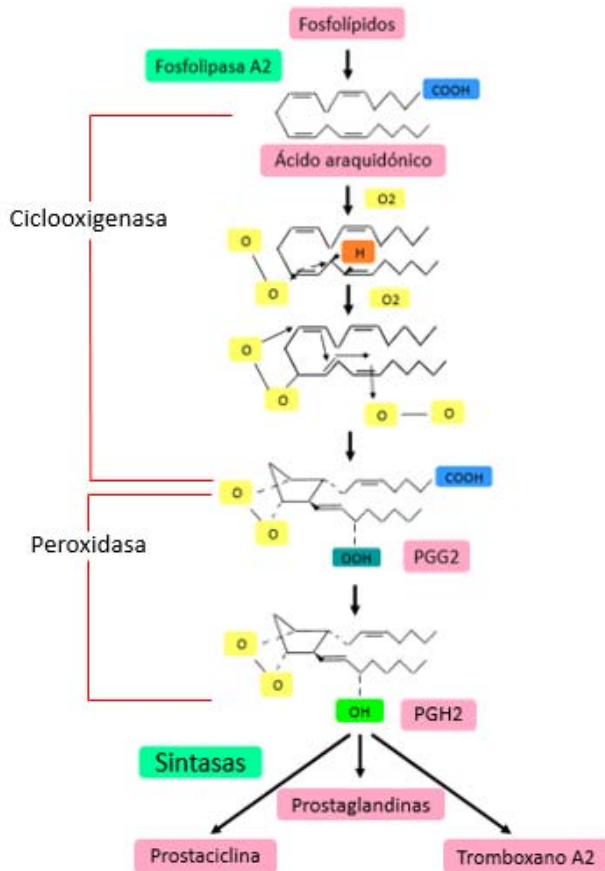


Fig. 5. Síntesis de prostanoides a partir del ácido araquidónico. Modificado de (Smith, DeWitt et al. 2000, Wong and Vanhoutte 2010)

Para que cada prostaglandina lleve a cabo su función, es necesaria la unión a su receptor específico (receptor de prostaglandina D, receptor de prostaglandina E, receptor de prostaglandina F, receptor de prostaciclina y receptor de tromboxano) (Félétou, Huang et al. 2011). Estos receptores se localizan en la membrana externa de las células de músculo liso y activan vías de señalización mediadas por proteínas G, que, dependiendo del receptor activado, se activa el proceso de contracción o dilatación del músculo liso, por ejemplo, en el sistema cardiovascular el TxA<sub>2</sub> es un poderoso vasoconstrictor, mientras que la PGI<sub>2</sub> actúa como vasodilatador (Félétou, Huang et al. 2011).



## Estructura de ciclooxygenasas 1 y 2

Las COXs son producto de genes diferentes, y comparten 65% de homología de aminoácidos en mamíferos, sin embargo, pueden tener de 85 % a 90% de homología dentro de una misma especie (Félétou, Huang et al. 2011). Son homodímeros, cada monómero contiene tres dominios estructurales, el dominio semejante al factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) conformado por 50 aminoácidos en la región amino terminal (el cual es importante para el correcto plegamiento del monómero), un dominio de unión a membrana (MBD por sus siglas en inglés) que contiene aminoácidos aromáticos que forman una superficie hidrofóbica que interactúa con la membrana lipídica de las células compuesto por 50 aminoácidos y un dominio globular catalítico con aproximadamente 460 aminoácidos en la región del carboxilo terminal, figura 6 (Smith, DeWitt et al. 2000).

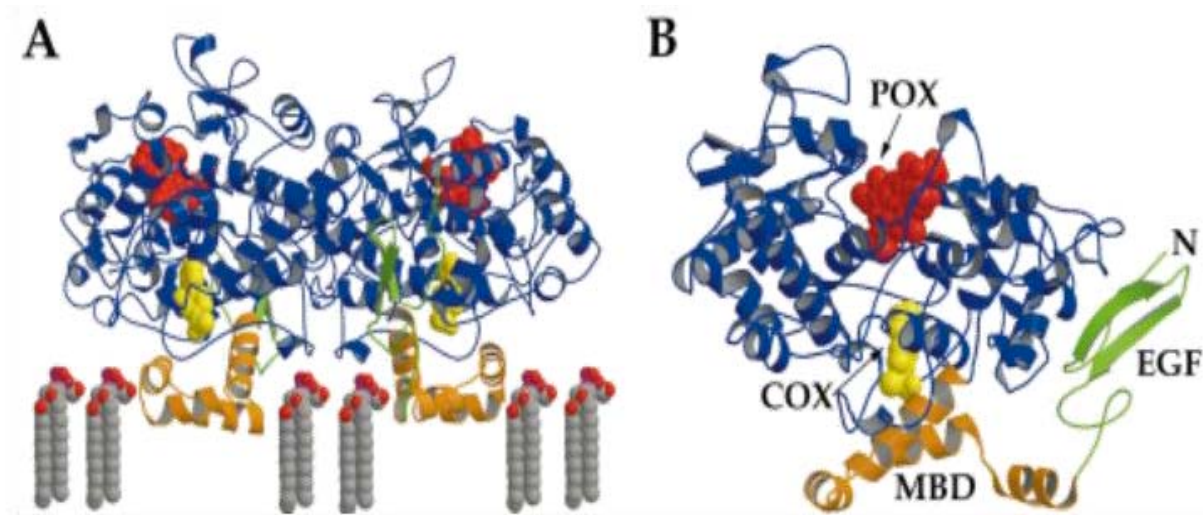


Figura 6. Estructura de ciclooxygenasas. A) Se observa la unión de la ciclooxygenasa a la membrana celular. B) indica el sitio activo de la ciclooxygenasa (COX), el sitio activo peroxidasa (POX). Tanto en A como en B el color verde indica el dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF), de color naranja se indica el dominio de unión a membrana (MBD), de color azul el dominio catalítico y de rojo se muestran los grupos hemo. (Smith, DeWitt et al. 2000)

### **1.3.3.1 Ciclooxygenasa 1**

La ciclooxygenasa 1 (COX-1) también conocida como prostaglandina-endoperóxido sintasa 1 (Sayers, Barrett et al. 2009) tiene un peso molecular de 69.05 kDa, teniendo 576 aminoácidos en su estructura (García and Gómez-Reino 2000, Smith, DeWitt et al. 2000) y su localización cromosómica está en el cromosoma 9; se encuentra conservada en chimpancé, perro, vaca, ratón, pollo, pez cebra y rana (NCBI). Se expresa constitutivamente en la mayoría de tejidos y requiere concentraciones altas de ácido araquidónico para ser activada (Félétou, Huang et al. 2011).

### **1.3.3.2 Ciclooxygenasa 2**

La ciclooxygenasa 2 (COX-2) también conocida como prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (Sayers, Barrett et al. 2009); tiene un peso molecular de 69.09 kDa, conteniendo 587 aminoácidos en su estructura (García and Gómez-Reino 2000, Smith, DeWitt et al. 2000); y su localización cromosómica está en el brazo largo del cromosoma 1, se encuentra conservada en chimpancé, perro, vaca, ratón, pollo, pez cebra y rana (NCBI). Su expresión es inducida a menudo en sitios de inflamación, sin embargo, algunos tipos celulares la expresan constitutivamente, incluyendo células endoteliales, siendo sobreexpresada en casos donde las células endoteliales estén siendo sometidas a estrés (Félétou, Huang et al. 2011), como durante la hipertensión arterial. La activación de COX-2 requiere concentraciones menores de ácido araquidónico en comparación a de COX-1, lo que sugiere que COX-2 se activa en presencia de COX-1 sin que esta última tenga actividad (Félétou, Huang et al. 2011).

De esta manera, como se mencionó anteriormente, las NOSs y las COXs son intermediarios en la regulación del tono vascular, así que cualquier cambio en la expresión génica, proteínica o en la localización celular de estas enzimas contribuyen al desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como lo es la diabetes, la obesidad o la hipertensión arterial entre otras.

## 1.4 Hipertensión arterial (HTA)

La hipertensión arterial se define como el estado patológico donde de manera crónica se presenta una presión arterial elevada (PA), con presión sistólica igual o superior a 140 mmHg y una tensión diastólica igual o superior a 90 mmHg, los niveles normales de PA, son necesarios para el correcto funcionamiento de todos los órganos y particularmente importantes para órganos vitales como el corazón, cerebro y los riñones (Salud 2013, Mozaffarian, Benjamin et al. 2015). La HTA se clasifica en dos tipos principales, la HTA primaria donde se desconocen los factores que contribuyen a su aparición, y la HTA secundaria, en la cual se conoce la causa que desencadena dicha enfermedad, por ejemplo, falla renal.

En el año de 1980 a nivel mundial se diagnosticaron 600 millones de personas que padecían hipertensión arterial, para el año 2008 aumentó esta cifra a 1,000 millones de personas, lo que implica que en el transcurso de 28 años incrementó 40% la cifra de personas afectadas por este padecimiento (Salud 2013, Mozaffarian, Benjamin et al. 2015). Este incremento de la población diagnosticada con HTA se atribuye principalmente al envejecimiento de la población, Figura 7; sin embargo, una dieta inadecuada, el consumo del alcohol, la inactividad física, el sobrepeso o la exposición prolongada al estrés son factores que contribuyen al desarrollo de la HTA (Salud 2013, Mozaffarian, Benjamin et al. 2015).

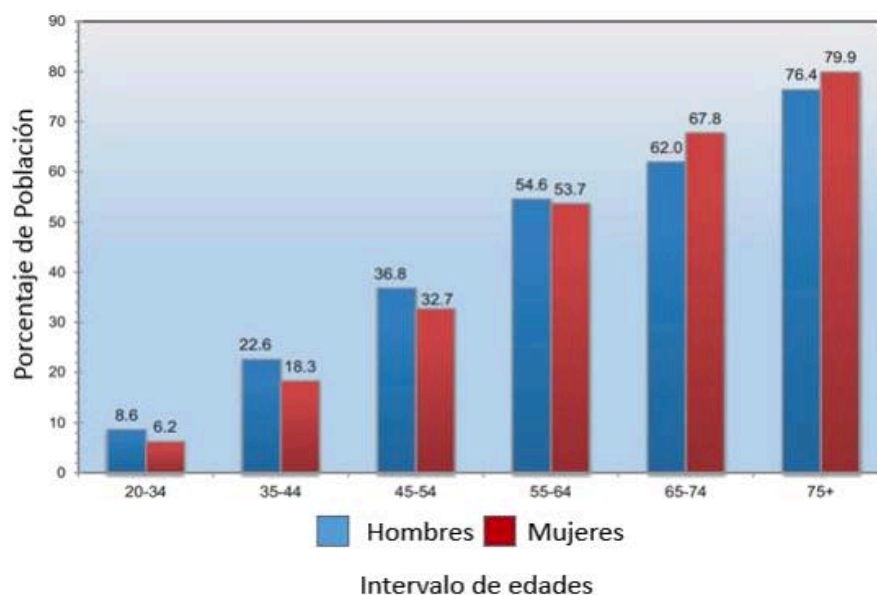


Fig. 7.  
Prevalencia  
de  
hipertensión  
arterial por  
edad y sexo.  
(Mozaffarian,  
Benjamin et  
al. 2015)

Las consecuencias de la HTA para la salud son complejas, ya que aumenta la probabilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares (ECV), como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal. El problema se exagera, ya que las ECV son la primera causa de muerte en todo el mundo, del total de muertes por ECV, el 55% es por causa de la HTA. Las complicaciones causadas por la HTA conducen anualmente a 9.4 millones de muertes a nivel mundial, a pesar de ser una de las principales causas de muerte en el mundo las alteraciones fisiopatológicas que conducen su desarrollo permanecen sin ser completamente conocidas (Salud 2013, Mozaffarian, Benjamin et al. 2015).

A pesar de que se desconocen las causas por las que se desarrolla la HTA, ahora se sabe que cambios en la expresión proteínica de las NOSs y las COXs se encuentran involucrados en el desarrollo y evolución de esta (Qu, Leung et al. 2010)

## 2.0 ANTECEDENTES

Además, se ha reportado que en diferentes patologías como el síndrome metabólico (SM) los sistemas enzimáticos de las NOSs y de las COXs se encuentran alterados, Martínez y colaboradores observaron en arteria femoral de ratas Zucker (ratas obesas) que la expresión proteínica de eNOS y COX-1 no se modifica en comparación con ratas control, no obstante, la expresión proteínica de nNOS, iNOS y COX-2 se ve modificada comparándolas con arterias femorales de ratas control, figura 8 (Martínez, Hernández et al. 2014).

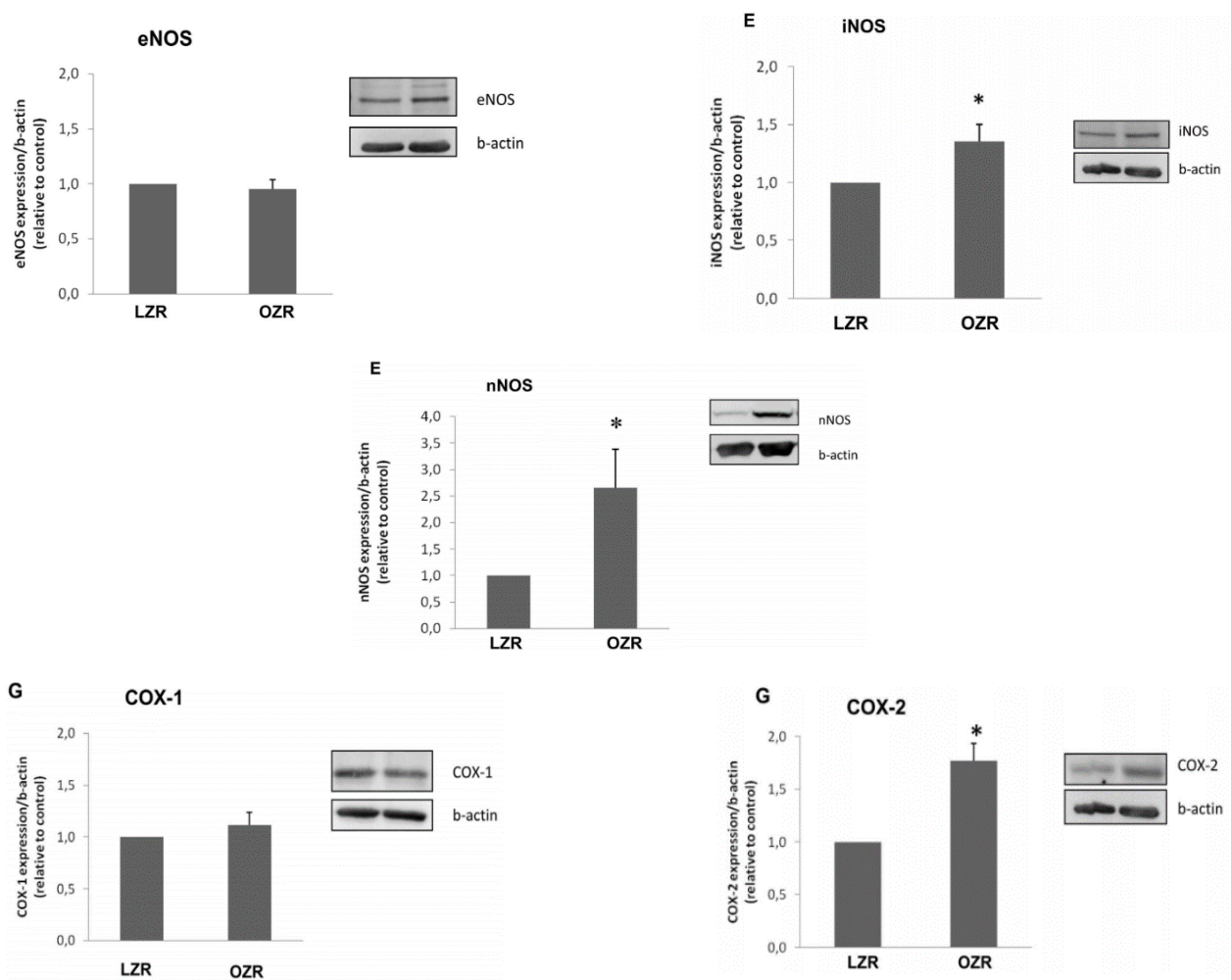


Figura 8. Cambios en la expresión proteínica de iNOS, nNOS y COX-2 en arteria femoral de ratas Zucker (ratas obesas) comparándolas con ratas Wistar (ratas no obesas). (Martínez, Hernández et al. 2014)

Además, la localización celular de nNOS y COX-2 se modificó en la arteria femoral de las ratas Zucker comparadas con las ratas control, ya que tales enzimas, además de presentarse en las células endoteliales también se encontraron en la capa adventicia, mientras que la localización de las eNOS, iNOS y COX-1 no cambió solamente se presentaron a nivel endotelial, figura 9 (Martínez, Hernández et al. 2014).

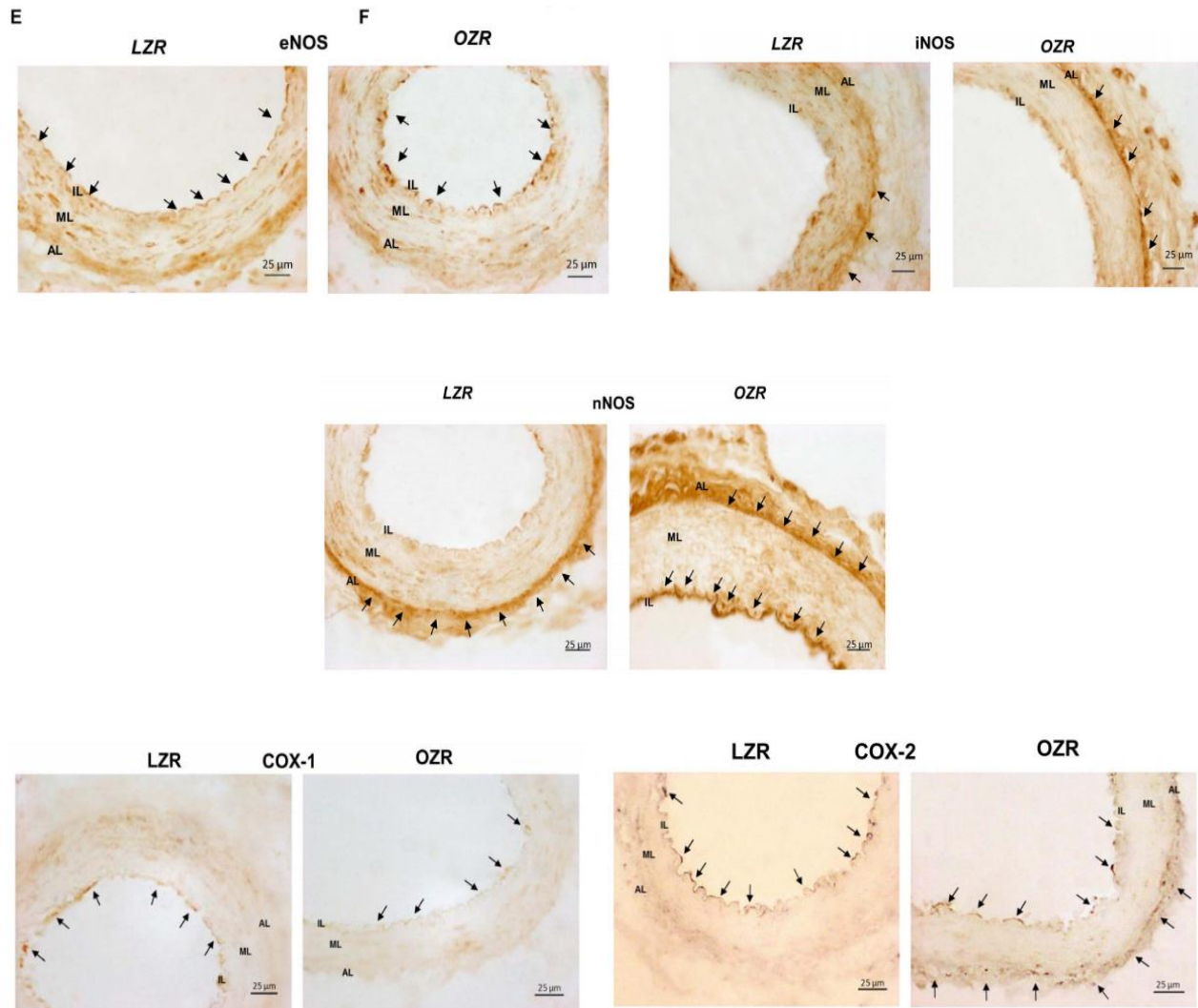


Figura 9 Cambios en la localización de NOSs y COXs en arteria femoral de ratas Zucker comparándolas con ratas no obesas. (Martínez, Hernández et al. 2014).

Por otra parte, se conoce poco acerca de la participación de las NOSs y las COXs en el desarrollo de la HTA secundaria por lo que determinar el papel de estas enzimas en los mecanismos que contribuyen al desarrollo de la hipertensión secundaria a la inhibición de la síntesis de ON, nos podrían brindar información importante acerca de la patogénesis de la HTA.

En un modelo de ratas con HTA secundaria inducida con L-NAME (inhibidor no selectivo de la ON sintasa) se ha observado que en la aorta de ratas hipertensas hay una disminución de la expresión proteínica de eNOS en comparación con las ratas normotensas (figura 10 A). Así mismo, se ha visto un aumento en la expresión proteínica de COX-1 y COX-2 en células endoteliales y músculo liso de aorta de ratas hipertensas comparada con las arterias de ratas normotensas, (figura 10 B y C) (Qu, Leung et al. 2010).

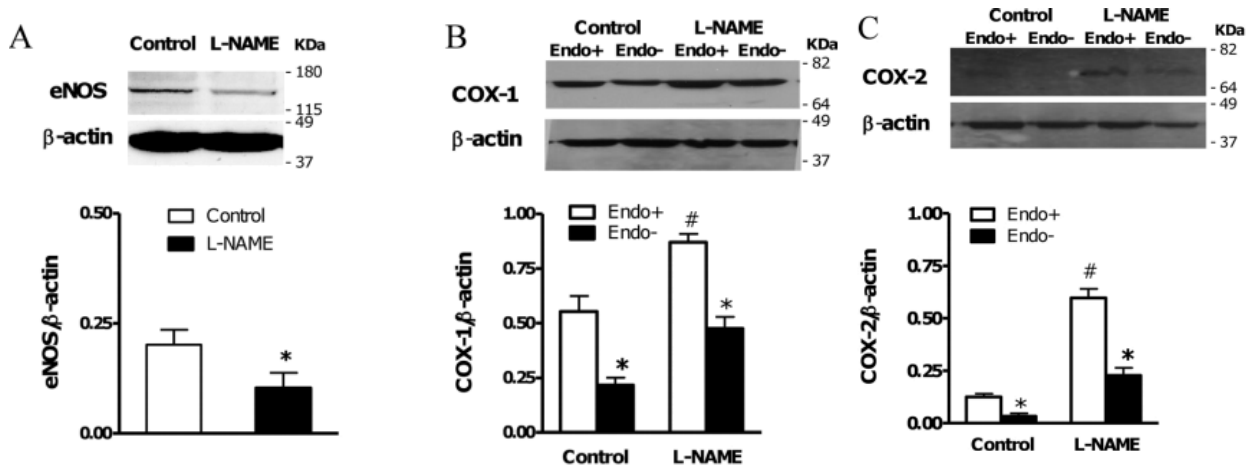


Figura 10. Cambios en la expresión proteínica de NOSs, COXs en aorta de ratas con hipertensión secundaria inducidas con L-NAME. A) Disminución de eNOS en ratas con HTA. B) y C) Aumento de COX-1 y COX-2 en ratas con HTA comparándolas con normotensas. (Qu, Leung et al. 2010).

En cuanto a la localización de eNOS, COX-1 y COX-2 en arteria aorta se observó que eNOS se expresa a nivel endotelial en ratas normotensas y en menor medida en ratas hipertensas; por otro lado, COX-1 y COX-2 se localiza a nivel endotelial en ratas normotensas, mientras que, en ratas hipertensas se localizan tanto a nivel endotelial como en células de músculo liso, figura 11 (Qu, Leung et al. 2010).

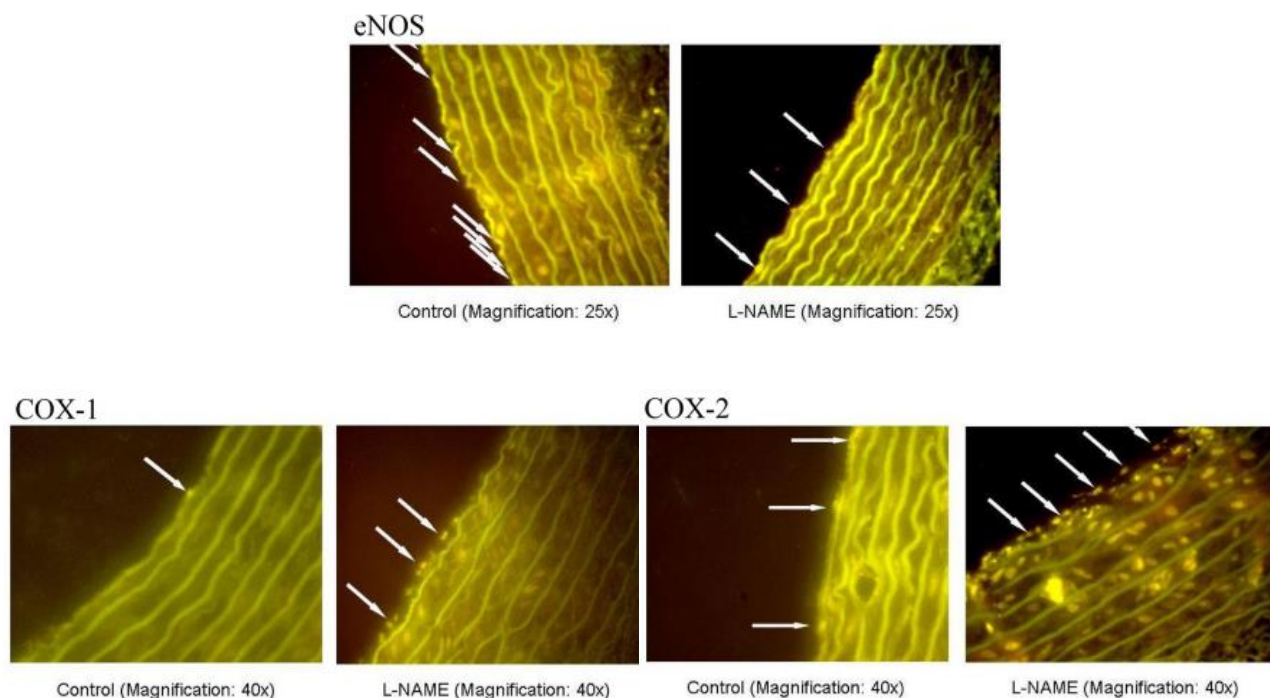


Figura 11. Localización de eNOS, COX-1 y COX-2 en arteria aorta de ratas normotensas y ratas con hipertensión secundaria inducidas con L-NAME mediante inmunofluorescencia. (Qu, Leung et al. 2010).

Con lo anterior podemos observar que durante el desarrollo de diferentes enfermedades las NOSs y las COXs presentan cambios en su expresión proteínica así como en su localización celular, lo que nos lleva a pensar que en un modelo de HTA secundaria estos sistemas de enzimas se modifican y contribuyen al desarrollo daño vascular y al establecimiento de la HTA.



### **3.0 JUSTIFICACIÓN**

La HTA es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y durante su desarrollo se altera la actividad de diferentes rutas enzimáticas que están involucradas en la regulación del tono vascular. Tal es el caso de las NOSs y las COXs que catalizan la síntesis de ON y los PGs respectivamente; cuya expresión proteínica y localización celular se modifican durante esta enfermedad. Sin embargo, se desconoce la influencia de cada isoforma en la regulación del tono vascular durante la HTA.

Por lo anterior, resulta importante investigar en un modelo de ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de ON, la función de las NOSs y de las COXs en la regulación de la actividad contráctil en la aorta y si esto puede conducir a desajuste en el tono vascular durante la HTA.

### **4.0 HIPÓTESIS**

Con la inhibición crónica de la síntesis de ON esperamos que las isoformas de NOS (eNOS, iNOS y nNOS) y los prostanoïdes derivados de las ciclooxigenasas 1 y 2 tengan mayor influencia sobre la actividad contráctil de la aorta.

### **5.0 OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

- Determinar la participación del ON derivado de las sintasas de óxido nítrico (endotelial, neuronal e inducible) y de los metabolitos de las ciclooxigenasas (1 y 2) en la regulación de la contracción en aorta en un modelo de HTA secundaria inducida con L-NAME.

#### **Objetivos particulares**

- Evaluar la elevación de la presión arterial sistólica provocada por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico en ratas Wistar macho.

- Evaluar la participación del ON derivado de la eNOS, iNOS y nNOS en respuesta al aumento de tensión isométrica provocado por la fenilefrina en anillos de aorta de ratas hipertensas inducidas con L-NAME.
- Evaluar la participación de los prostanoideos derivados de la COX-1 y COX-2 en la tensión isométrica inducida por la fenilefrina en anillos de aorta de ratas hipertensas inducidas con L-NAME.

## 6.0 MÉTODOS

### 6.1 Reactivos

Se utilizaron los fármacos L-NAME y carbacol, y el reactivo EDTA (marca SIGMA), las sales; NaCl, KCl, CaCl $\cdot$ 2H $_2$ O, NaHCO $_3$  y dextrosa (marca J. T. Baker), MgSO $_4$  $\cdot$ 7H $_2$ O (marca MERCK), KH $_2$ PO $_4$  (marca REASOL) y pentobarbital (PISABENTAL®, uso veterinario).

### 6.2 Animales

Se utilizaron 44 ratas macho, cepa Wistar, que fueron divididas en dos grupos, el grupo normotenso (grupo control, n=22) y el segundo grupo al que se le indujo HTA secundaria (n=22). Las ratas fueron adquiridas y mantenidas en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, con un peso de 200 a 300 g. y se tuvieron en condiciones ambientales controladas, con comida y agua *ad libitum*. El manejo de las ratas fue realizado conforme a la Norma Oficial Mexicana para uso y cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México).

### 6.3 Medición de la presión arterial sistólica (PAS).

La presión arterial sistólica se midió de manera indirecta en la base de la cola, registrando el pulso sistólico de presión de la arteria caudal. Con la finalidad de dilatar las arterias y detectar el pulso cardiaco, cada rata fue colocada en un cepo de acrílico y a su vez en un equipo con un sistema de calefacción que las mantuvo a una temperatura de 36° a 38° C. Se realizó una medición basal de la PAS (antes de iniciar

el tratamiento con L-NAME), a los 8 días de iniciado el tratamiento con L-NAME y una medición final (a los 15 días de tratamiento) a las ratas de los dos grupos.

El registro de la PAS se realizó con un sensor IITC, el cual tiene una celda fotosensible y un manguillo de hule látex que puede inflarse y desinflarse. La cola de la rata se introduce en el manguillo, el cual está conectado a un esfigmomanómetro que suministra la presión necesaria para que se infle rápidamente el hule látex, de esta manera se obstruye el flujo sanguíneo de la arteria caudal y conforme se va desinflando se capta el valor de PAS. Las señales resultantes de la fotocelda y del esfigmomanómetro fueron captadas simultáneamente por el sistema LE 5007, Letica, Panlab, España.

#### **6.4 Inducción de hipertensión arterial secundaria**

La hipertensión arterial fue inducida mediante la administración del fármaco N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) en el agua de beber en una dosis de 75 mg/kg de peso cada 24 horas durante 15 días.

#### **6.5 Obtención de aorta torácica**

Para la obtención de la aorta torácica se anestesiaron a las ratas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PISABENTAL®) en dosis de 60 mg/kg de peso. Posteriormente, se realizó una laparotomía torácica para la obtención de la arteria aorta, evitando lastimar el tejido.

La aorta se colocó en una caja Petri con solución Krebs (NaCl, 118 mM; KCl, 4.6 mM; MgSO $_4$ •7H $_2$ O, 1.2 mM; KH $_2$ PO $_4$ , 1.2 mM; CaCl•2H $_2$ O, 1.5 mM; dextrosa, 5.5 mM; NaHCO $_3$ , 24.9 mM y EDTA, 0.027 mM.) y se removió el tejido conectivo y adiposo. Posteriormente, la arteria se cortó en 6 anillos de aproximadamente 4-5 mm, a 3 de ellos se les removió el endotelio (-E) por frotación de la superficie de la íntima con la punta de una pinza y los 3 restantes se dejaron intactos (+E).

## 6.6 Esquema de inhibición *in vitro* para NOSs y COXs

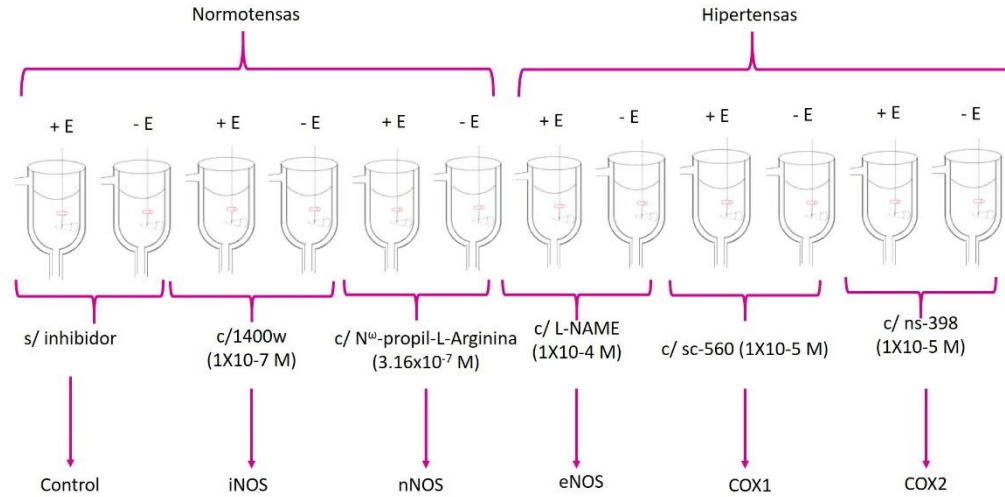


Figura 12. Inhibición de las NOSs y COXs en órgano aislado. Se muestra como fueron montados los anillos de arteria aorta de ratas normotensas e hipertensas en las cámaras de órgano aislado y se indica el inhibidor utilizado para cada enzima, iNOS con 1400w, nNOS con N<sup>ω</sup>-propil-L-arginina, eNOS con L-NAME, COX1 con sc-560 y COX2 con ns-398. +E=con endotelio, -E=sin endotelio,

## 6.7 Registro de la contracción isométrica de la aorta en cámara de órgano aislado

Para medir los cambios en la tensión isométrica cada anillo fue colocado en una cámara de órgano aislado, sujetado entre dos ganchos de acero inoxidable (Nikrom), uno colocado en la parte inferior de la cámara y el otro colocado a un transductor de tensión isométrica (modelo FT03 Grass force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Wawick, RI, USA), el cual se encuentra acoplado a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems Inc., Santa Bárbara, CA. EUA), los datos de la tensión isométrica fueron registrados mediante el uso del software Acqknowledge (versión 3.9.1).

Los anillos arteriales se sometieron a una tensión inicial de 3 g y se lavaron 3 veces cada 10 minutos con 10 ml de solución Krebs, burbujeo constante de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, a un pH de 7.4 y a una temperatura de 37° C. Posteriormente, al finalizar cada periodo de estabilización los anillos se estimularon tres veces con una solución de fenilefrina a una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M, dejando reposar 30 minutos entre cada

estimulación. Para verificar la funcionalidad del endotelio se analizó la respuesta relajante a carbacol (el cual es un análogo sintético de la acetilcolina) a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M; los fármacos fueron retirados del medio mediante lavados con solución Krebs, figura 13 a.

Posteriormente, se realizaron dos curvas concentración-respuesta al agonista adrenérgico fenilefrina (de  $1 \times 10^{-9}$  M a  $3.1 \times 10^{-5}$  M). Al finalizar la primera curva (curva control) se retiró la fenilefrina mediante lavados con solución Krebs y se dejó recuperar el tejido durante 30 minutos, figura 13 b, tras el periodo de recuperación se procedió a realizar una segunda curva a fenilefrina en presencia del inhibidor selectivo para cada enzima siguiendo el esquema explicado en la figura 13 c. Además, se incluyeron anillos en donde se realizaron las curvas a la fenilefrina sin la presencia del inhibidor para verificar la reproducibilidad de la respuesta adrenérgica durante el todo el protocolo experimental.

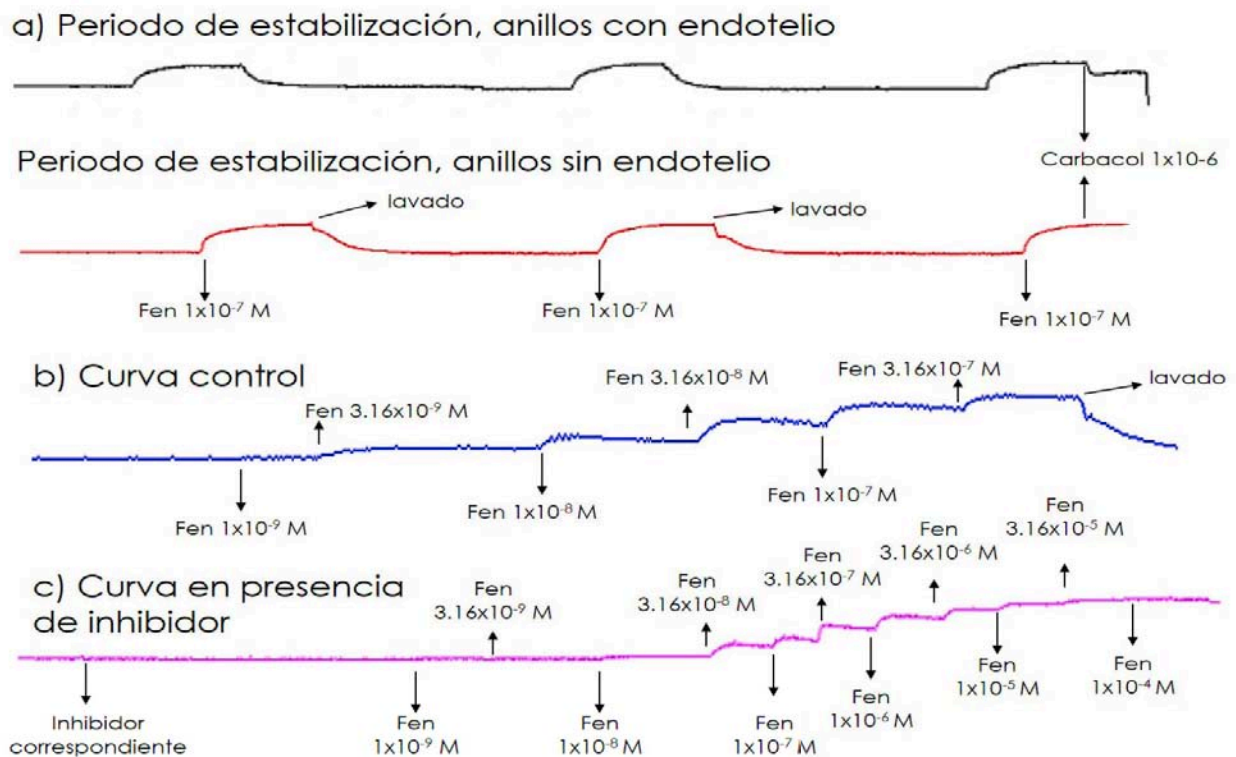


Figura 13. Protocolo para evaluar el efecto de los inhibidores de las COXs y NOSs sobre la contracción de los anillos arteriales. a) Periodo de estabilización del tejido, b) En el mismo anillo de aorta se realizaron curvas concentración respuesta a concentraciones crecientes y acumulativas a fenilefrina (curva control), y c) curvas concentración respuesta a concentraciones crecientes y acumulativas a fenilefrina en presencia de inhibidores selectivos de NOSs y COXs (Curva en presencia de inhibidor). Fen= Fenilefrina.

## 6.8 Análisis de resultados

Los datos son expresados como la media  $\pm$  ee de 6 a 8 anillos de aorta de diferentes animales. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina de los grupos de ratas o por la presencia de inhibidores, se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) seguido de una prueba de Bonferroni mediante el software GraphPad Prism 5, considerándose que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias cuando los valores de  $p < 0.05$ .

La CE50 se obtuvo por medio del análisis de regresión no lineal, usando un modelo sigmoideal para el ajuste de las curvas concentración-respuesta usando el software sigma plot11, CE50 se refiere a la concentración de fenilefrina necesaria para producir el 50% de la contracción máxima. Posteriormente se calculó la “relación de concentraciones efectiva a 50” (Rel. de CE50), que se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\frac{CE50c}{CE50i} = Rel. de CE50 \quad \text{ó} \quad \frac{CE50ce}{CE50se} = Rel. de CE50$$

Dónde: CE50c es la concentración de fenilefrina sin inhibidor, CE50i es la concentración de fenilefrina en presencia de los inhibidores selectivos para NOSs y COXs, CE50ce es la concentración de fenilefrina con endotelio y CE50se es la concentración de fenilefrina sin inhibidor.

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1. Efecto del L-NAME en la presión arterial sistólica de ratas Wistar.

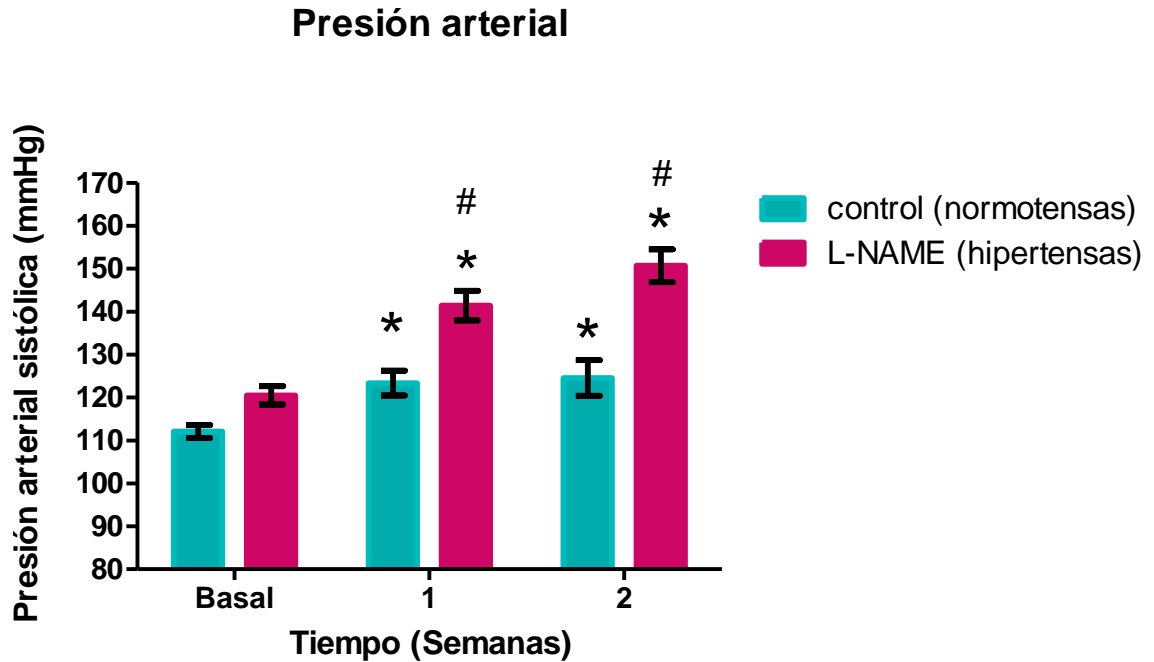


Figura 14. Curso temporal de la presión arterial sistólica antes (medición basal) y después de la administración de L-NAME 75 mg/kg/día durante 2 semanas. # $p=0.05$ , 1er y 2da semana vs medición basal (antes de la administración de L-NAME), \* $p=0.05$ , hipertensas vs normotensas;  $n=44$ ;  $\pm 4$  ee control,  $\pm 8$  ee L-NAME

Con la finalidad de evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de ON sobre la presión arterial sistólica (PAS) se administró L-NAME (inhibidor de NOS) en el agua de bebida durante 15 días a un grupo de ratas. En la figura 14 se muestran los valores de PAS antes (basal) y después de 1 o 2 semanas de tratamiento con L-NAME, la PAS basal de las ratas control (color azul) y las que fueron destinadas para la administración del fármaco L-NAME (barra roja) tuvieron valores normotensión (<140 mmHg). A los 7 días de la administración de L-NAME, la PAS se elevó a 141 mmHg mientras que las ratas controles mantuvieron valores de normotensión (123 mmHg); para la segunda semana de tratamiento el aumento de la PAS fue mayor con valores de 151 mmHg en comparación con el grupo control cuya PAS se mantuvo constante (124 mmHg) (figura

14). Lo que indica que la inhibición crónica de la síntesis de ON con L-NAME promueve el aumento de la presión arterial y desarrollo de la hipertensión arterial.

### 7.2. Curva concentración-respuesta a fenilefrina de anillos de arteria aorta: Comparación entre ratas normotensas e hipertensas.

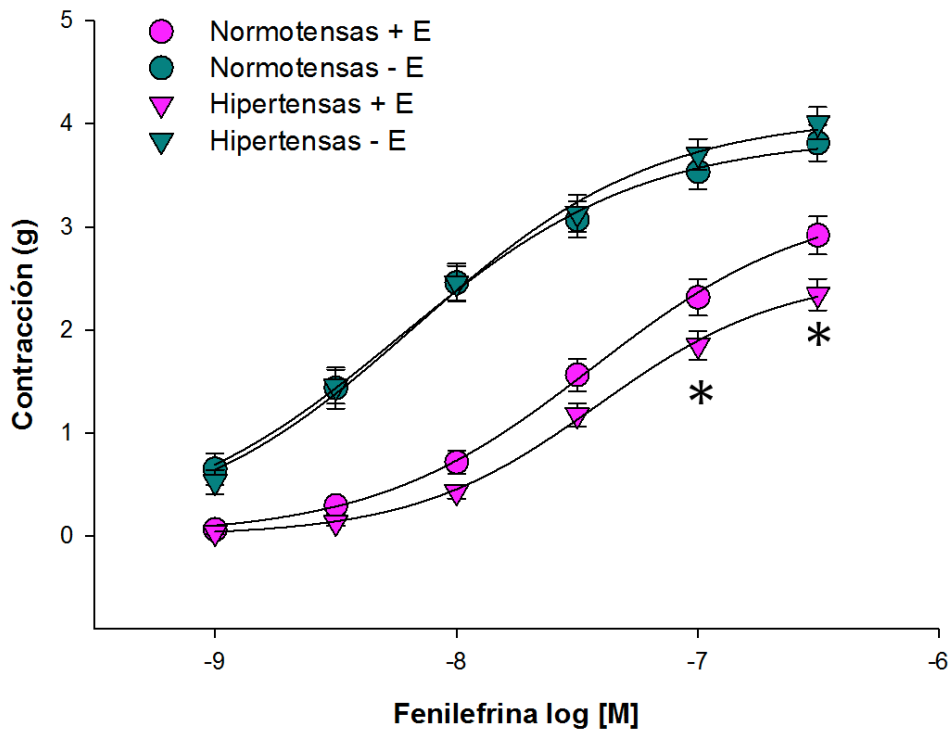


Figura 15. Efecto contráctil de la fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha_1$ ) de anillos con (E+) y sin endotelio (E-) de aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. \* $P < 0.05$  vs normotensa,  $n = 44-67$  anillos con o sin endotelio.

Con la finalidad de evaluar la influencia de sustancias liberadas por las células endoteliales sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina se removió el endotelio en algunos anillos de aorta de ratas normotensas e hipertensas. En figura 15 se puede observar que la fenilefrina provocó en los anillos arteriales un aumento de la respuesta contráctil dependiente de la concentración del fármaco, que alcanzó el efecto máximo



(Emax) con  $3.1 \times 10^{-6}$  de fenilefrina, siendo significativamente mayor la contracción en anillos arteriales sin endotelio. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la respuesta contráctil a fenilefrina en anillos sin endotelio de ratas normotensas e hipertensas. Sin embargo, de manera interesante se presentó una menor contracción en los anillos arteriales con endotelio de ratas hipertensas comparada con los anillos con endotelio de ratas normotensas, indicando que factores derivados del endotelio tienen mayor influencia sobre la contracción en aorta de ratas tratadas con L-NAME (figura 15).

Tabla 1. Concentración efectiva 50 (CE50) a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha_1$ ) y la relación de concentración efectiva a 50 (Rel. de CE50) de anillos con y sin endotelio de ratas normotensas e hipertensas.

	fenilefrina	
	CE50	Rel. de CE50
Arterias con endotelio de ratas normotensas	$4.36 \times 10^{-8}$	7.58
Arterias sin endotelio de ratas normotensas	$5.75 \times 10^{-9}$	
Arterias con endotelio de ratas hipertensas	$4.36 \times 10^{-8}$	6
Arterias sin endotelio de ratas hipertensas	$7.24 \times 10^{-9}$	

Con la finalidad de determinar si el tratamiento crónico con L-NAME o la remoción del endotelio modifican la sensibilidad de la aorta a la fenilefrina se obtuvieron las concentraciones efectivas 50 (CE50) y la relación de la concentración efectiva a 50 (Rel. de CE50=CE50ce/CE50se) (tabla 1). Donde CE50ce es la concentración de fenilefrina necesaria para obtener el 50% del efecto máximo de anillos con endotelio y CE50se es la concentración de fenilefrina necesaria para obtener el 50% del efecto máximo de anillos sin endotelio. La relación de CE50 de anillos arteriales de ratas normotensas indica que la remoción del endotelio aumentó la sensibilidad de la aorta al agonista contráctil ya que se necesitó 7.58 veces menos concentración de fenilefrina en anillos sin endotelio comparados con los anillos con endotelio de ratas normotensas,

mientras que en anillos arteriales de ratas hipertensas se necesitó 6 veces menos concentración de fenilefrina (tabla 1), lo que implica que sustancias liberadas del endotelio (posiblemente ON o PGs) inhiben la contracción de la aorta, tanto en condiciones normales como durante la hipertensión arterial.

### 7.3. Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de arteria aorta: Efecto de la inhibición de las enzimas sintasas de óxido nítrico y ciclooxigenasas.

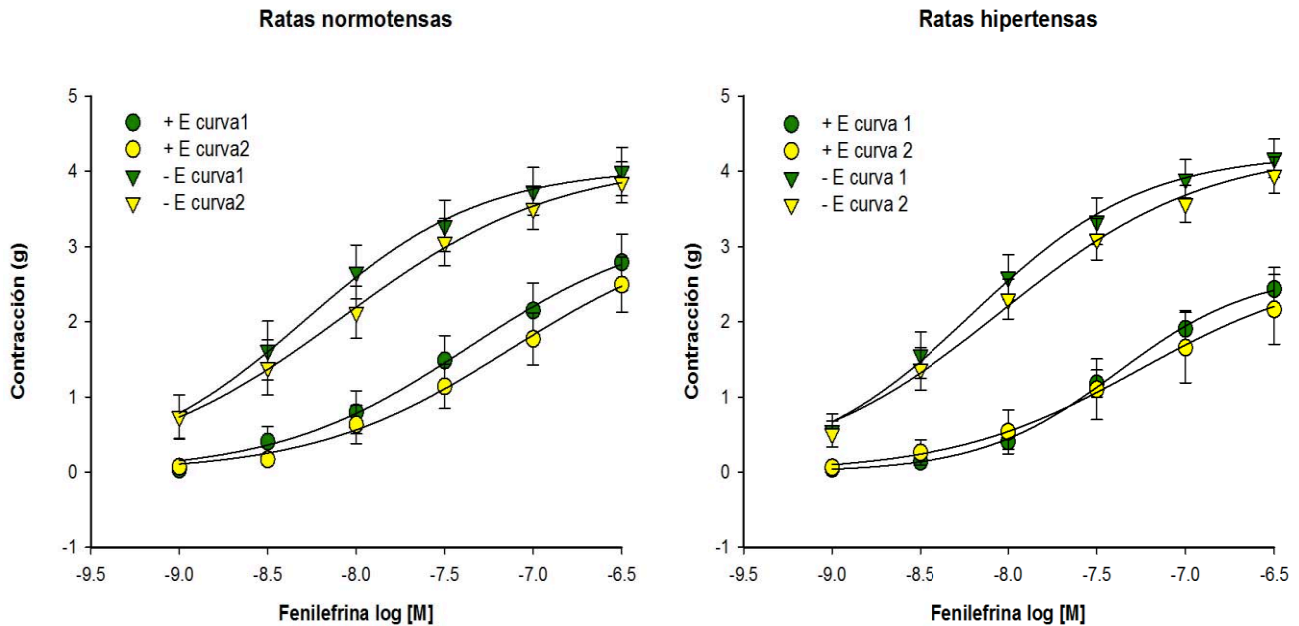


Figura 16. Curvas consecutivas a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha_1$ ) de anillos de aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. n = 12-19 anillos con (E+) o sin endotelio (E-).

Con el propósito de verificar que la contracción a la fenilefrina de los anillos arteriales es reproducible, se realizaron en el mismo anillo aórtico dos curvas consecutivas a fenilefrina en la ausencia de inhibidores. Con estos experimentos se observó que no hubo diferencias significativas en la respuesta a fenilefrina entre la curva 1 y la curva 2 tanto en anillos con endotelio como en anillos sin endotelio de ratas normotensas e hipertensas (figura 16). Lo que nos permite afirmar que los cambios en la actividad contráctil a fenilefrina en presencia de los inhibidores de las NOSs y de las COXs son causados por el bloqueó de la síntesis de la ON o los PGs respectivamente.

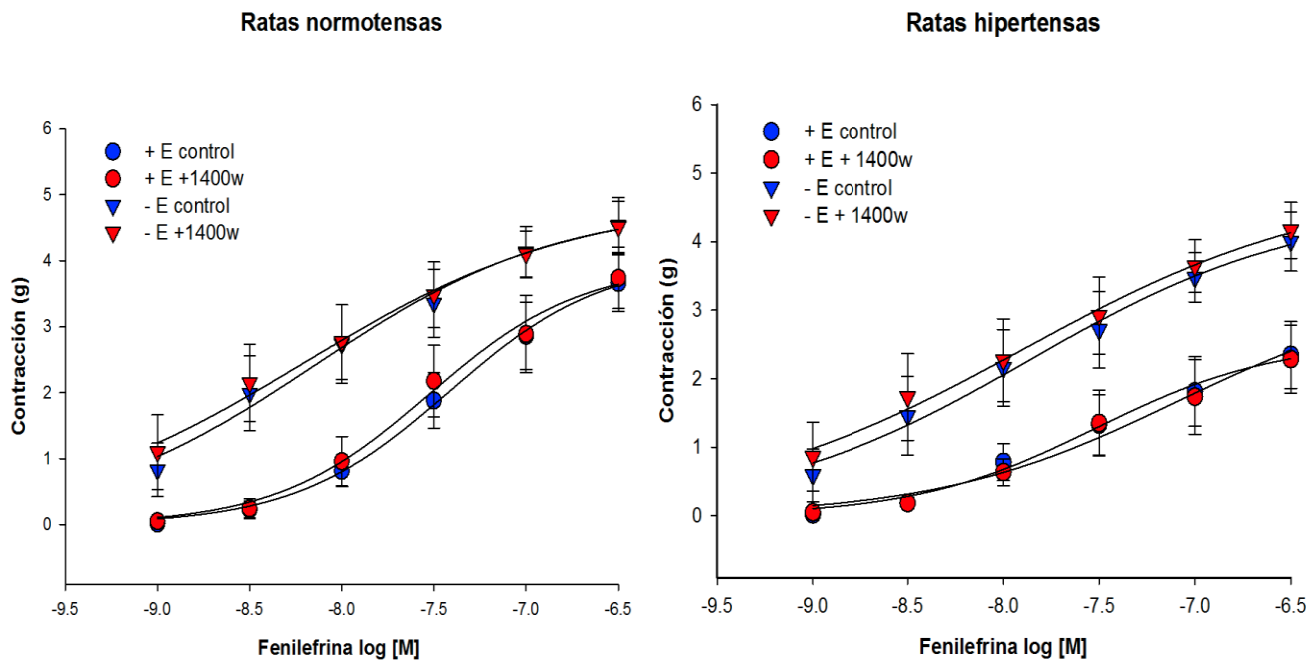


Figura 17. Efecto de la inhibición selectiva de la iNOS con 1400w sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. n = 7 anillos con (E+) o sin endotelio (E-).

Para conocer la influencia del ON derivado de la iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible) sobre el tono vascular de aorta, se midió la contracción de los anillos con y sin endotelio de ratas control o hipertensas en presencia del inhibidor selectivo (1400w). Con estos experimentos se obtuvo que la inhibición de la enzima iNOS no modificó la contracción al agonista adrenérgico en ninguna de las condiciones experimentales, lo que descarta la posible influencia de ON derivado iNOS en la contracción a la fenilefrina tanto en ratas normotensas e hipertensas (figura 17).

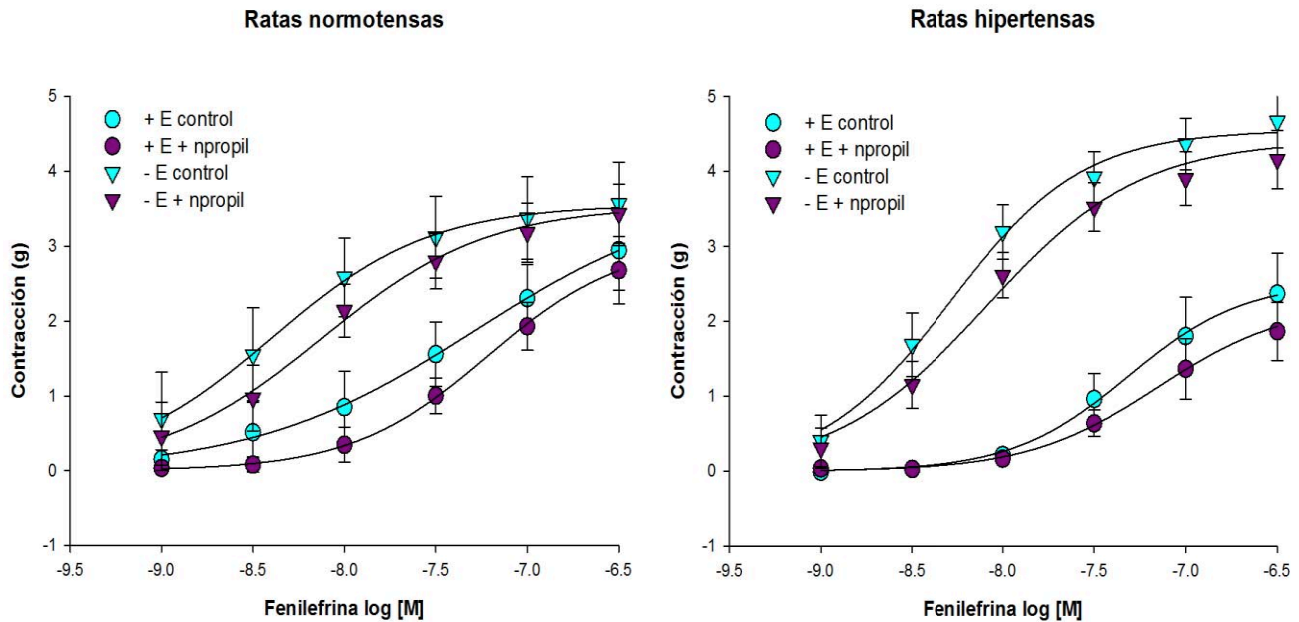


Figura 18. Efecto de la inhibición selectiva de nNOS con n-propil-L-arginina sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. n = 7 anillos con (E+) o sin endotelio (E-).

En cuanto a la participación de nNOS en la contracción de aorta inducida por fenilefrina en la figura 18 se muestra que hay una ligera tendencia a disminuir la contracción en presencia del inhibidor selectivo de la enzima, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos de ratas (normotensas e hipertensas).

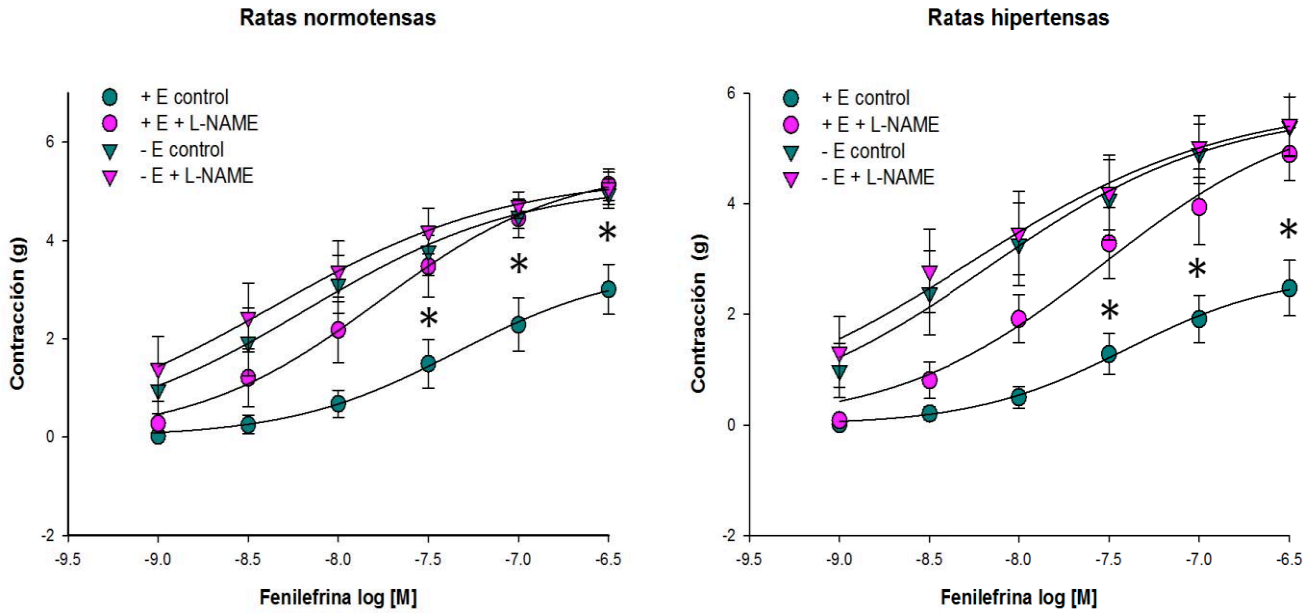


Figura 19. Efecto de la inhibición no selectiva de la NOS con L-NAME sobre la respuesta contráctil a fenilefrina de aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. n = 8-9 anillos con (E+) o sin endotelio (E-). \*p<0.05 vs control

Con el objetivo de determinar la participación de los productos de eNOS en la actividad contráctil de los anillos arteriales, se utilizó el inhibidor no selectivo L-NAME, el cual es capaz de inhibir a las 3 isoformas de NOSs, sin embargo, debido a que los inhibidores selectivos para iNOS y nNOS (1400w y n-propil-L-arginina, respectivamente) no modificaron la contracción a la fenilefrina, podemos sugerir que los efectos con L-NAME están relacionados con la actividad de eNOS. Los resultados muestran que la inhibición de la síntesis de ON con L-NAME aumentó la contracción inducida por la fenilefrina en anillos con endotelio de ratas normotensas e hipertensas, siendo mayores las diferencias con las concentraciones más altas de fenilefrina (figura 19), lo que indica que el NO derivado de la eNOS tiene un papel fundamental en la regulación de tono vascular aórtico en ratas normales e hipertensas.

Tabla 2. Concentración efectiva 50 (CE50) a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha_1$ ) y la relación de concentración efectiva 50 (Rel. de CE50) de anillos sin y con L-NAME de ratas normotensas e hipertensas.

	Arterias con endotelio de ratas normotensas		Arterias con endotelio de ratas hipertensas		Arterias sin endotelio de ratas normotensas		Arterias sin endotelio de ratas hipertensas	
	CE50	Rel. de CE50	CE50	Rel. de CE50	CE50	Rel. de CE50	CE50	Rel. de CE50
Fenilefrina	$5.01 \times 10^{-8}$	3.17	$3.98 \times 10^{-8}$	1.26	$3.98 \times 10^{-9}$	1	$6.30 \times 10^{-9}$	1.26
Fenilefrina + L-NAME	$1.58 \times 10^{-8}$		$3.16 \times 10^{-8}$		$3.98 \times 10^{-9}$		$5.01 \times 10^{-9}$	

Con el objetivo de saber si la inhibición de las isoformas de NOS provoca algún cambio en la sensibilidad de la aorta a la fenilefrina se obtuvo la relación de CE50 en la ausencia y presencia del inhibidor L-NAME ( $Rel\ CE50 = CE50C/CE50I$ ). Los inhibidores selectivos para las isoformas iNOS y nNOS no modificaron la sensibilidad de la aorta a la fenilefrina ya que la Rel CE50 fue cercana a 1 (datos no mostrados). En la tabla 2 observamos que se necesitó 3.17 veces menos fenilefrina para obtener el 50% de contracción máxima en los anillos con endotelio que fueron expuestos a L-NAME de ratas normotensas comparados con los que no fueron expuestos a L-NAME. En contraste con lo que sucede con los anillos con endotelio de ratas normotensas, la inhibición del ON con L-NAME no modificó la sensibilidad a la fenilefrina en los anillos con endotelio de animales hipertensos ya que la Rel CE50 fue 1.26, es importante mencionar que este valor es semejante al que se obtuvo en anillos sin endotelio.

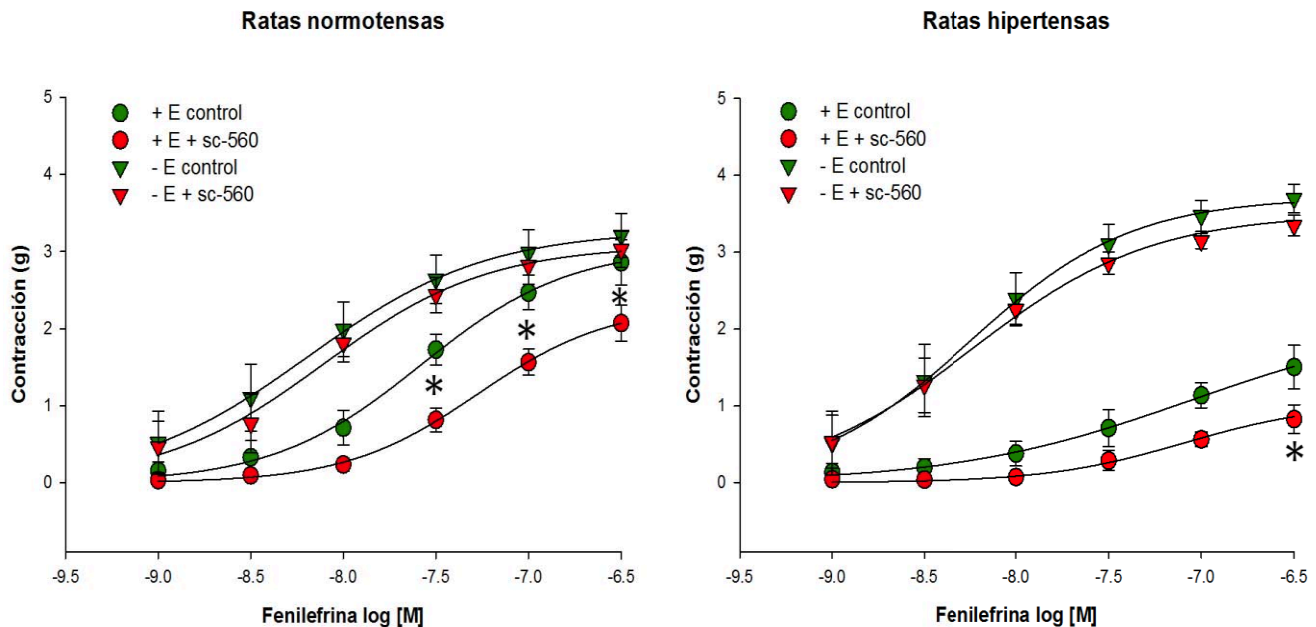


Figura 20. Efecto de la inhibición selectiva de la COX-1 con sc-560 sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de la aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. n = 8 anillos con (E+) o sin endotelio (E-). \*p<0.05 vs control

Con el propósito de evaluar la participación de los metabolitos de la ciclooxygenasa 1 en la respuesta contráctil de los anillos arteriales, se utilizó el inhibidor selectivo de la COX-1 el sc-560, donde se obtuvo que los anillos con endotelio de ratas normotensas e hipertensas en presencia del inhibidor contrajeron en menor grado que los anillos sin inhibidor. Por otro lado, los anillos de ratas normotensas e hipertensas que se les retiró el endotelio no presentaron diferencias en la respuesta contráctil, lo que implica que las prostaglandinas que participan en el proceso de contracción se están generando en las células endoteliales, figura 20.

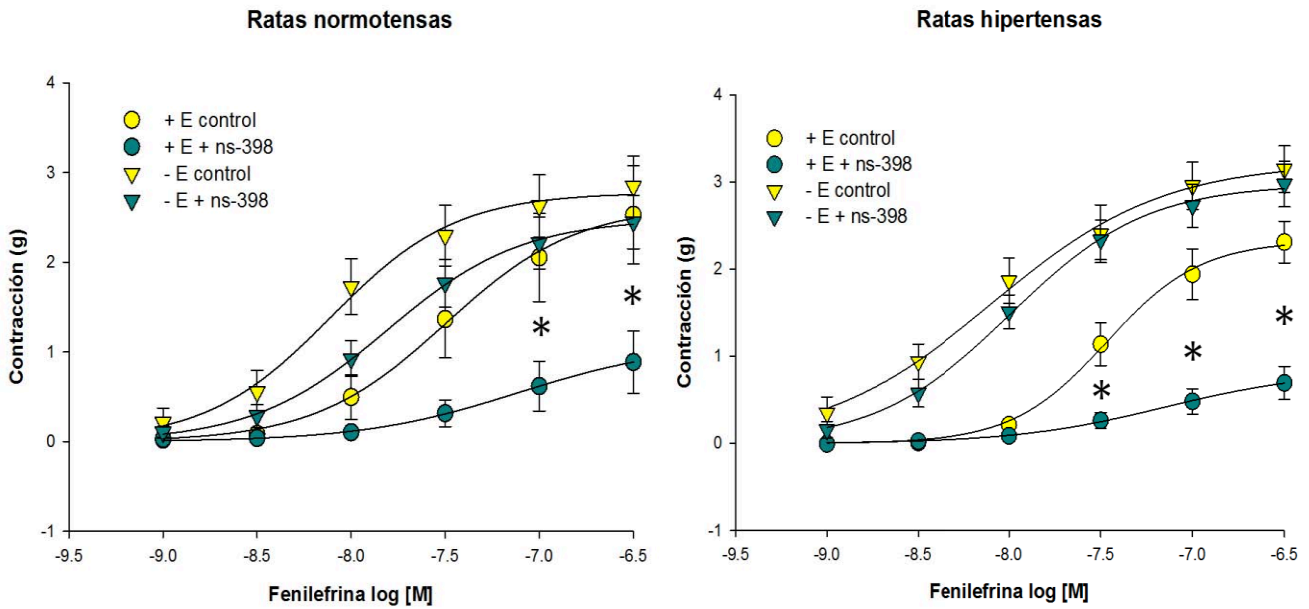


Figura 21. Efecto de la inhibición selectiva de COX-2 con ns-398 sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina (agonista vaso contráctil) de la aorta de ratas normotensas e hipertensas. En el eje de las ordenadas se muestra la contracción a la fenilefrina en gramos y en el eje de las abscisas la concentración de fenilefrina expresada como logaritmo de la concentración molar. n = 10 anillos con (E+) o sin endotelio (E-). \*p<0.05 vs control

Finalmente, para averiguar el papel de los prostanoides derivados de la ciclooxigenasa 2 en la regulación de contracción de arteria aorta, se utilizó el inhibidor selectivo de la COX-2 el ns-398. Los resultados muestran que la inhibición selectiva de la COX-2 en las arterias con endotelio reduce drásticamente el efecto contráctil de la fenilefrina en los grupos normotenso e hipertenso mientras que en las arterias sin endotelio el ns-398 no provocó cambios significativos en la respuesta de la fenilefrina en ambos grupos (figura 21).



Tabla 3. Concentración efectiva 50 (CE50) a fenilefrina (agonista adrenérgico  $\alpha_1$ ) y la relación de concentración efectiva 50 (Rel. de CE50) de anillos sin y con el ns398 (inhibidor selectivo de la COX-2) de ratas normotensas e hipertensas.

	Arterias con endotelio de ratas normotensas		Arterias con endotelio de ratas hipertensas		Arterias sin endotelio de ratas normotensas		Arterias sin endotelio de ratas hipertensas	
	CE50	Rel. de CE50	CE50	Rel. de CE50	CE50	Rel. de CE50	CE50	Rel. de CE50
Fenilefrina	$3.16 \times 10^{-8}$	0.40	$3.16 \times 10^{-8}$	0.50	$7.94 \times 10^{-9}$	0.50	$7.94 \times 10^{-9}$	0.79
Fenilefrina + ns-398	$7.94 \times 10^{-8}$		$6.30 \times 10^{-8}$		$1.58 \times 10^{-8}$		$1 \times 10^{-8}$	

La inhibición de la COX-1 no modifica la sensibilidad de la aorta con o sin endotelio, debido a que la rel CE50 fue 1 tanto en el grupo normotenso como en el hipertenso (datos no mostrados). En la tabla 3 se observa que en los anillos con endotelio que fueron expuestos a ns-398 se requirió 0.40 y 0.50 veces más fenilefrina para obtener el 50% de la contracción máxima en ratas normotensas e hipertensas comparados con los que no fueron expuestos al inhibidor selectivo para COX-2, lo que implica que los anillos con endotelio de ratas normotensas e hipertensas perdieron sensibilidad a la fenilefrina. Además, la inhibición de COX-2 en los anillos sin endotelio de ratas normotensas incrementó la CE50 de fenilefrina 0.50 veces, lo que indica que COX-2 no solo se encuentra a nivel endotelial sino también en el músculo liso de la aorta de ratas normotensas.

## 8.0 DISCUSIÓN

Los principales hallazgos del presente trabajo indican que la síntesis de ON por la eNOS inhiben la contracción provocada por la fenilefrina en la aorta de ratas normotensas e hipertensas. Este efecto fue más importante en los animales hipertensos, lo que sugiere que la deficiencia de ON provocada por el tratamiento crónico con L-NAME incrementa la actividad o la expresión de la isoforma eNOS presente en las células endoteliales. Una explicación alternativa a este fenómeno podría ser que se incrementen la producción de otras sustancias vasodilatadoras en respuesta a la deficiencia de ON. Además encontramos que prostanoïdes vasoconstrictores derivados de la COX-1 pero principalmente de la COX-2 contribuyen al efecto contráctil de la fenilefrina. Un aspecto particularmente interesante es que influencia los prostanoïdes vasoconstrictores derivados de la COX-1 sobre la contracción inducida por la fenilefrina esta disminuida en las ratas hipertensas mientras que la actividad de la COX-2 no parece estar modificada.

### **Inducción de hipertensión arterial secundaria mediante la administración de L-NAME.**

Nuestros resultados muestran que las ratas del grupo control tuvieron valores de presión arterial de normotensión (<140 mmHg) durante todo el experimento, de igual forma la PAS de las ratas que fueron administradas con L-NAME (75 mg/kg/día durante 15 días) presentaron una presión arterial inicial de  $120 \pm 2.1$  mmHg, a los 8 días de iniciado el tratamiento con L-NAME desarrollaron hipertensión arterial con valores de  $141 \pm 3.5$  mm Hg y al finalizar el tratamiento encontramos valores de  $151 \pm 3.8$  mmHg (figura 14). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kristek y colaboradores en 2015, quienes administraron L-NAME (50mg/kg/día) durante seis semanas observando un aumento significativo de la PAS a partir de la primera semana con valores de 140 mmHg y finalizando en 165 mmHg en ratas Wistar. La diferencia en la PAS final de 14 mmHg con respecto a nuestros datos probablemente se debe a la dosis de L-NAME administrada y/o al tiempo de tratamiento. El L-NAME compite con el sustrato la L-arginina, por la unión a las isoformas de las sintasas de óxido nítrico, lo que evita que se forme ON y con ello disminuye el contenido de GMPc en la pared

arterial, lo que contribuye a la disminución del proceso dilatador de los vasos sanguíneos y por consiguiente al aumento de la resistencia vascular periférica (Jean-François, Warin et al. 1992) y de la presión sanguínea (Das, Kravtsov et al. 1999).

Se ha reportado que en la hipertensión arterial provocada por la inhibición farmacológica de óxido nítrico, no sólo participa la deficiencia de ON, sino que están asociados diversos factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, como el incremento en la sensibilidad vascular a  $\alpha_2$ -adrenoreceptores (Kanagy 1997, Giovannitti, Thoms et al. 2015), el aumento de los niveles de angiotensina II (Ang II), los niveles de renina (Guzmán-Hernández, Villalobos-Molina et al. 2015), los cuales, participan en el proceso contráctil del músculo liso vascular.

### **Contracción promovida por fenilefrina en arteria aorta de ratas normotensas e hipertensas.**

El análisis de la contracción de aorta torácica provocada por fenilefrina mostró que la remoción del endotelio indujo un aumento de la actividad contráctil en ambos grupos (ratas normotensas e hipertensas) (figura 15), lo que indica que en el endotelio se producen sustancias relajantes que modulan el proceso de contracción, además, en la tabla 1 podemos observar que las CE50s de los anillos sin endotelio fueron 7.58 y 6 veces más pequeñas que en los anillos con endotelio para las ratas normotensas e hipertensas respectivamente, lo que demuestra la participación endotelial durante la contracción de la arteria aorta en ratas en ambos grupos de ratas.

De manera interesante, en anillos con endotelio la contracción máxima mediada por la de fenilefrina fue significativamente menor en ratas hipertensas (figura 15), lo que sugiere que durante el desarrollo de HTA en este modelo, se activan mecanismos vasodilatadores dependientes de endotelio compensatorios que regulan la dilatación de la arteria aorta. Estos resultados concuerdan con estudios donde se observó una menor respuesta contráctil de anillos arteriales aórticos que fueron tratados con L-NAME (Cacanyiova, Berenyiova et al. 2014). En este sentido, Furchgott y Zawadzki demostraron que es necesaria la presencia de endotelio en los vasos sanguíneos para producir relajación (Furchgott and Zawadzki 1980). Es decir, el ON sintetizado en el

endotelio vascular es el principal responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos, lo cual es esencial para la regulación de su tono (Moncada, *et al.*, 1993). Además, se ha observado que la liberación de ON de las células endoteliales en respuesta al estímulo de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos (agonistas vasocontráctiles como la fenilefrina) inhibe la respuesta contráctil (Gürdal, Can *et al.* 2005). Algunos estudios sugieren que la vasoconstricción inducida por el agonista provoca indirectamente la liberación de ON del endotelio, esto a través del paso de calcio de las células de musculo liso a las células endoteliales, ya que se ha observado que la fenilefrina es capaz de aumentar los niveles intracelulares de calcio de las células musculares lisas (Dora, Doyle *et al.* 1997, Sekiguchi, Miyake *et al.* 2001, Gürdal, Can *et al.* 2005).

Como ya se había mencionado en el presente estudio se observó una menor contracción a fenilefrina de los anillos aórticos con endotelio de ratas tratadas con L-NAME (figura 15). Es importante mencionar que la contracción de los vasos es influenciada por factores como la presencia y distribución de fibras de elastina, colágeno, matriz extracelular y fibras musculares lisas, en condiciones patológicas como en la HTA se encuentran alterados, y ello modifica la respuesta contráctil de las células musculares lisas (Cacanyiova, Berenyiova *et al.* 2014), este fenómeno no explica la disminución de la respuesta contráctil que observamos, ya que en los anillos sin endotelio la contracción no se modificó en los animales hipertensos.

En este sentido se ha observado que la deficiencia en la síntesis de ON por la administración de L-NAME promueve alteraciones arteriales como lesiones fibróticas y disminución de la expresión de proteínas contráctiles (Bernátová, Pechánová *et al.* 2002). También se ha reportado un incremento en la rigidez de las paredes arteriales asociada a la hipertensión arterial provocada por la disminución farmacológica de ON (Fitch, Rutledge *et al.* 2006).

Por otro lado, se ha observado un aumento de las ciclooxigenasas 1 y 2 en el modelo de HTA por inhibición farmacológica del ON (Qu, Leung *et al.* 2010), este aumento conlleva a una mayor producción de prostanoïdes, como prostaciclina (Guzmán-Hernández, Villalobos-Molina *et al.* 2015) que contribuyen en la relajación de los vasos sanguíneos (Félétou, Huang *et al.* 2011) estos eventos podrían presentarse

como una respuesta compensatoria al déficit de ON, para mantener la contracción observada en nuestro estudio (figura 15).

### **Efecto de la inhibición de la sintasa de óxido nítrico inducible, neuronal y endotelial en la contracción de arteria aorta**

Las sintasas de óxido nítrico están presentes en diferentes tipos celulares como neuronas, macrófagos, células endoteliales y pueden estar una o varias isoformas en un mismo tipo celular. La isoforma iNOS se ha localizado de forma constitutiva en células del sistema inmune, como macrófagos y de manera ocasional en linfocitos, neutrófilos y eosinófilos (Förstermann, Closs et al. 1994), sin embargo, iNOS se ha detectado funcionalmente en células endoteliales de arteria aorta en modelos de HTA primaria como lo son las ratas espontáneamente hipertensas (SHR por sus siglas en inglés), donde se observó que su inhibición provocaba mayor contracción de la arteria aorta con endotelio, efecto que se pierde al retirar el endotelio, lo que indica que en condiciones patológicas como en HTA la iNOS participa en modular la contracción (Álvarez, Briones et al. 2008). Así mismo en el modelo de HTA por bloqueo farmacológico de ON (L-NAME 50mg/kg/8 semanas) se ha reportado la expresión de mRNA y proteína de iNOS en aortas de ratas Wistar (Luvarà, Pueyo et al. 1998). A pesar de esto, nosotros observamos que iNOS no tiene una función reguladora de la contracción de arteria aorta a fenilefrina en nuestro modelo (75 mg/kg/2 semanas) (figura 17). Con esto podemos suponer que aunque la enzima esté presente en nuestro modelo de estudio, no necesariamente participa en la regulación del tono vascular, tanto en condiciones normales como en la HTA, esto quizá puede estar en relación con la severidad y tiempo de establecimiento de la HTA, ya que el modelo de HTA provocada por la administración de L-NAME involucra dos etapas, una etapa temprana caracterizada por la elevación de la presión sanguínea y una segunda etapa que está asociada al desarrollo acelerado de daños en diferentes órganos (Jean-François, Abdel-llah et al. 1993).

Por otro lado, se ha descrito que iNOS se expresa durante procesos inflamatorios asociados a HTA primaria (Álvarez, Briones et al. 2008) y se ha reportado

un aumento en el mRNA y en la proteína de moléculas de adhesión celular vascular como VCAM e ICAM (las cuales participan en el reclutamiento de leucocitos que secretan citocinas proinflamatorias) a la vez que se presenta un aumento del mRNA y proteína de iNOS durante la HTA (Luvarà, Pueyo et al. 1998) lo que nos indica que iNOS se expresa de forma inducible durante la inflamación y que su presencia puede estar relacionada a un proceso diferente de la contracción. Con respecto a esto, algunas citocinas proinflamatorias que son secretadas por los leucocitos son interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) las cuales tienen elementos de unión específicos a DNA que interactúan con el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B por sus siglas en inglés) el cual participa en procesos que conducen a inflamación (De Caterina, Libby et al. 1995) y que puede estar relacionado con el estado de inflamación que se presenta en la HTA. Además, se ha observado que en aortas de ratas tratadas con L-NAME (50 mg/kg/8 semanas) se activa NF- $\kappa$ B y este a su vez promueve el estado inflamatorio en los vasos sanguíneos (Gonzalez, Fontaine et al. 2000); por el contrario, se ha visto en cultivo de células endoteliales que el ON inhibe la activación de NF- $\kappa$ B (Hai-Bing, Libby et al. 1995). Es necesario hacer hincapié que en el modelo que utilizamos (75 mg/kg/dos semanas) probablemente el bloqueo de la producción de ON no sea total, ya que se ha reportado que en modelos de HTA por administración de L-NAME existe una producción de ON residual (Seçilmiş, Özü et al. 2014) y es posible que este ON residual sea el responsable de inhibir procesos inflamatorios a través del bloqueo de NF- $\kappa$ B y con ello también evite la participación de iNOS.

Por otra parte, con respecto a la participación de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), se sabe en principio que es expresada constitutivamente en cerebro, neuronas, células epiteliales de pulmón, útero, estómago, en células de la macula densa de riñón y en músculo esquelético de humano (Förstermann, Closs et al. 1994). En el presente trabajo observamos que el ON derivado de la isoforma nNOS tampoco participa en la contracción de arteria aorta en nuestro modelo de estudio, ya que en la figura 18 se puede apreciar que no hubo diferencias en la contracción a fenilefrina. Este resultado concuerda con lo publicado por Cacanyiova en los años 2009 y 2014, donde demuestran que al bloquear nNOS con 7-NI (inhibidor selectivo de nNOS), no hay cambio en la contracción de arteria aorta de ratas Wistar estimulada con noradrenalina

(Cacanyiova, Kristek et al. 2009, Cacanyiova, Berenyiova et al. 2014). Sin embargo, esta enzima puede tener una participación indirecta en la HTA, ya que Boulanger reporta en células de músculo liso de arteria carótida, la expresión de mRNA de nNOS en el modelo de SHR, en el cual nNOS es activada por angiotensina II (Ang II) vía receptor AT<sub>1</sub> (Boulanger, Heymes et al. 1998), Ang II es un octapeptido que participa en el sistema renina-angiotensina (SRA), el cual está sobreactivado durante la HTA y participa en su desarrollo (Crowley, Gurley et al. 2006, Castro-Moreno, Pardo et al. 2012) y directamente en la contracción de los vasos sanguíneos. Esto quizá justifica el hecho de que no haya diferencia de contracción en los anillos arteriales del grupo de ratas normotensas (figura 19) ya que en condiciones fisiológicas angiotensina II no está sobreactivada (Boulanger, Heymes et al. 1998) y se sabe que en ratas Sprague-Dawley el ON es capaz de promover la regulación de la actividad de renina, la cual es una enzima que conduce a la producción de Ang II (Schricker, Hamann et al. 1995). Sin embargo, en nuestro grupo de estudio se ha reportado en ratas hipertensas, por déficit de ON, una mayor expresión de mRNA de renina y un aumento de la concentración plasmática de Ang II (Guzmán-Hernández, Villalobos-Molina et al. 2015), lo que sugiere que en las arterias como la aorta de ratas hipertensas (figura 18), otros agentes contráctiles como la fenilefrina no estimulan la actividad de nNOS.

En cuanto a la sintasa de óxido nítrico endotelial, esta isoforma es expresada de manera constitutiva en células endoteliales (Förstermann, Closs et al. 1994); en el presente estudio mostramos que eNOS tiene una participación regulatoria en el proceso de contracción de la arteria aorta de ratas normotensas e hipertensas, ya que en la figura 19 observamos un aumento en la contracción de las arterias con endotelio en presencia de L-NAME. Con relación a esto, se ha observado que la estimulación prolongada (6-12 hrs) de los  $\alpha_1$  adrenoreceptores por agonistas como la fenilefrina incrementa la expresión de eNOS en arterias aortas con endotelio de ratas Wistar (Gürdal, Can et al. 2005), lo que sugiere esta isoforma es uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta contráctil, ya que, en vasos de conductancia como la aorta, la vasodilatación dependiente de endotelio es atribuida (Capettini, Cortes et al. 2010) principalmente a la producción de ON (Pohl, De Wit et al.

2000), y está bien establecido que la sintasa de óxido nítrico endotelial es la principal responsable de la producción de ON.

Sin embargo, como ya se mencionó, a pesar de que la eNOS es expresada constitutivamente, existen diversos estímulos que promueven una mayor expresión de esta, como lo es el shear stress (estrés causado por el flujo sanguíneo) (Traub and Berk 1998), el cual, incrementa la transcripción de eNOS (Davis, Grumbach et al. 2004). Además, se ha reportado que el ON tiene la capacidad de regular la activación de la transcripción del mRNA de eNOS y promueve su actividad en respuesta a este tipo de estrés (Grumbach, Chen et al. 2005). Sin embargo, se ha observado que en SHR con hipertensión arterial establecida, se presenta un aumento del estrés causado por el flujo sanguíneo (Huang, Sun et al. 2000). En el modelo de HTA que utilizamos en este estudio no se ha reportado el cambio de este shear stress por lo que podemos suponer con base a la severidad y transcurso de tiempo de establecimiento de HTA de nuestro modelo que el aumento del Shear stress podría explicar el hecho de que haya un aumento en la actividad de eNOS en las hipertensas (figura 19).

Por otra parte, para que eNOS se active es necesario un aumento de calcio intracelular en las células endoteliales, esto permite la unión del complejo calcio/calmodulina y a su vez la unión de este complejo a los dominios de eNOS. Este aumento de calcio promueve la fosforilación de la serina 1177 de eNOS que permite el flujo de electrones del dominio oxidasa al dominio reductasa y con ello la producción de ON a partir de L-Arginina (Adams, Barakeh et al. 1989, Schneider, Kebir et al. 2003). Con respecto a esto, se ha observado que Ang II vía receptor  $AT_1$  tiene la capacidad de favorecer indirectamente la fosforilación de la serina 1177 de eNOS mediante la activación de la proteína cinasa AKT la cual activa al receptor IRAG y con ello se produce un aumento de calcio intracelular que concluye en la activación de eNOS (Khan, Wagner et al. 2006, Suzuki, Eguchi et al. 2006). Lo que nos permite sugerir que en nuestro modelo la sobreexpresión de Angiotensina II activa a la sintasa en las ratas hipertensas mediante el mecanismo antes mencionado.



## **Efecto de la inhibición de ciclooxigenasa 1 y ciclooxigenasa 2 en la contracción de arteria aorta**

La ciclooxigenasa 1 como se mencionó en la introducción se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, sin embargo, es expresada en niveles mayores en ciertas células y tejidos, como lo son el endotelio, monocitos, plaquetas, túbulos colectores renales y vesículas seminales (Smith, DeWitt et al. 2000). En el presente estudio observamos una disminución en la contracción de las arterias con endotelio en presencia del inhibidor específico para COX-1 (sc-560) en ratas normotensas e hipertensas (figura 20), lo que nos indica que COX-1 participa en la contracción de la aorta tanto para ratas normotensas como hipertensas. Esto concuerda con lo reportado en 2013 por Liu y colaboradores donde al utilizar un inhibidor de COX-1 observan una disminución de la contracción de arteria aorta abdominal en ratón. Además, se ha demostrado que la acetilcolina induce contracciones dependientes de endotelio que involucran la estimulación de COX-1, que a su vez produce factores contráctiles derivados de endotelio capaces de activar receptores TP en células de músculo liso (Yang, Félétou et al. 2003). Como ya se ha mencionado los receptores TP son receptores específicos de unión a tromboxano  $A_2$ , el cual es el principal prostanoides sintetizado por COX-1 y que al activar a su receptor promueve la contracción de las células musculares lisas (Caughey, Cleland et al. 2001, Félétou, Huang et al. 2011) a través de la activación de proteínas Gq y la subsiguiente activación de los receptores IP<sub>3</sub> del retículo sarcoplásmico que liberan calcio al espacio intracelular y con ello provocan el proceso de contracción del músculo liso (Villalba 2010); este mecanismo sugiere que la activación de los receptores alfa adrenérgicos (en este estudio) se asocia con la producción de PGs contráctiles derivados COX.

Otro prostanoides que es sintetizado por COX-1 es prostaciclina quien comúnmente se une a receptores IP provocando vasodilatación (Félétou, Huang et al. 2011), sin embargo se ha reportado que COX-1 produce prostaciclina y que esta puede generar vasoconstricción mediante la unión a receptores TP en arterias renales porcinas (Liu, Luo et al. 2012); de esta manera nosotros proponemos que tromboxano y prostaciclina pueden ser los prostanoides que están siendo generados por COX-1 y que contribuyen a la contracción observada en los anillos arteriales con endotelio en ratas normotensas que en hipertensas.

Finalmente, como ya se había mencionado, la expresión de ciclooxigenasa 2 se lleva a cabo de manera inducible, ya que diferentes estímulos como factores de crecimiento y mediadores de inflamación como interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$  por sus siglas en inglés) y lipopolisacáridos (LPS) promueven la expresión del gen de COX-2 (Smith, DeWitt et al. 2000). A pesar de esto, en ciertos tejidos COX-2 es expresada constitutivamente, como lo es en cerebro, timo, intestino y riñón (Kirkby, Chan et al. 2016). En el presente estudio mostramos que COX-2 tiene una participación regulatoria en la contracción de arteria aorta tanto de ratas normotensas como hipertensas, ya que en la figura 21 podemos observar una disminución de la contracción de los anillos arteriales en presencia de NS-398 (inhibidor selectivo para COX-2) tanto en ratas normotensas como en hipertensas. Este resultado concuerda con lo reportado por Chaignat y colaboradores en 2008 los cuales observaron una menor actividad contráctil del músculo liso de uréteres de humano y de cerdo al utilizar diclofenaco (inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas). Además, se ha reportado que en cerdos tratados con L-NAME existe una sobreexpresión de COX-2 en macula densa (Kommareddy, McAllister et al. 2011), lo que nos indica que el inhibir la producción de NO contribuye a la sobreexpresión de COX-2.

En la arteria aorta, existen otros factores que influyen en la expresión de esta enzima, se ha reportado que el shear stress tiene la capacidad de activar la expresión génica de COX-2 en células endoteliales (Inoue, Taba et al. 2002). Otro factor relacionado con la expresión de esta ciclooxigena es Ang II, ya que se ha observado que vía receptor AT<sub>1</sub> es capaz de estimular la expresión de COX-2 en células de músculo liso de aorta de rata (Morinelli, Walker et al. 2008). Así mismo, la presencia de Ang II en células endoteliales y en células de músculo liso promueve una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), y a su vez, estas promueven la mayor expresión y actividad de COX-2 (Griendling, Minieri et al. 1994, Kiritoshi, Nishikawa et al. 2003, Martínez-Revelles, Avendaño et al. 2012, Dikalov and Nazarewicz 2013). De esta manera nosotros podemos suponer que además de Ang II, las EROs son otros factores que promueve la mayor generación de COX-2 así como de su actividad y explica lo observado en nuestros resultados.

Por otra parte, uno de los productos del ácido araquidónico es la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) la cual mediante la unión a su receptor IP es un efectivo vasodilatador que es formado por las ciclooxygenasas que se encuentran localizadas en la pared de los vasos sanguíneos particularmente en las células endoteliales (Belo and Talesnik 1982) y se ha reportado que en este tipo de células la COX-2 es la principal responsable de la mayor producción de prostaciclina (McAdam, Catella-Lawson et al. 1999), y como ya se mencionó, prostaciclina es capaz de unirse a receptores TP promoviendo contracción en el músculo liso (Liu, Luo et al. 2012).

En resumen, nuestros resultados muestran que eNOS, COX-1 y COX-2 participan en la regulación de la contracción de la arteria aorta tanto en ratas normotensas como en ratas hipertensas y proponemos que el ON y prostanoides vasoconstrictores como tromboxano A<sub>2</sub>, la PGH<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> son los principales componentes producidos por estas tres enzimas que modulan el proceso contráctil, por lo que se pretende en futuros estudios realizar los experimentos necesarios para comprobar esto. Además, con base en la bibliografía mencionada podemos decir que factores como agonistas α adrenérgicos, renina, Ang II, shear stress y EROs están modulando la expresión y la actividad de eNOS, COX-1 y COX-2 en el modelo estudiado en el presente estudio

## 9.0 CONCLUSIONES

- La administración de L-NAME por vía oral produce el desarrollo de hipertensión arterial secundaria en la rata.
- La HTA secundaria inducida con L-NAME disminuye la contracción en aortas por un mecanismo que involucra a las células endoteliales.
- iNOS y nNOS no participan en la regulación de la respuesta contráctil a fenilefrina de aortas con y sin endotelio de ratas normotensas e hipertensas.
- El ON liberado por eNOS a nivel de células endoteliales regula la contracción a fenilefrina en aorta de ratas normotensas e hipertensas.
- Las enzimas COX-1 y COX-2 endoteliales generan prostanoideos vasocontráctiles que contribuyen a la contracción inducida por fenilefrina en la aorta de ratas normotensas e hipertensas. Sin embargo, la influencia de los metabolitos derivados de la COX-1 es menor en la aorta de ratas HTA.

## Bibliografia

- Adams, D. J., J. Barakeh, R. Laskey and C. V. Breemen (1989). "Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells." The FASEB Journal **3**: 2389-2400.
- Álvarez, Y., A. M. Briones, R. Hernanz, J. V. Pérez-Girón, M. J. Alonso and M. Salaices (2008). "Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats." British Journal of Pharmacology **153**: 926-935.
- Belo, S. E. and J. Talesnik (1982). "Coronary vasoconstrictor and vasodilator actions of arachidonic acid in the isolated perfused heart of the rat." British Journal Pharmacology **75**: 269-286.
- Bernátová, I., O. Pechánová, P. Babál, S. Kyselá, S. Stvrtina and R. Andriantsitohaina (2002). "Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension." Journal Physiology Heart **282**: H924-H948.
- Boulanger, C. M., C. Heymes, J. Benessiano, R. S. Geske, B. I. Lévy and P. M. Vanhoutte (1998). "Neuronal Nitric Oxide Synthase Is Expressed in Rat Vascular Smooth Muscle Cells: Activation by Angiotensin II in Hypertension." Journal of the American Heart Association **83**: 1271-1278.
- Cacanyiova, S., A. Berenyiova, M. Malekova, F. Kristek, I. Dovinova, P. Krenek, L. Pivackova and I. Pifkova (2014). "Different vasoactive effects of chronic endothelial and neuronal NO-synthase inhibition in Young Wistar rats." Journal Physiology Biochemistry **70**: 749-760.
- Cacanyiova, S., F. Kristek, M. Gerova, P. Krenek and J. Klimas (2009). "Effect of chronic nNOS inhibition on blood pressure, vasoactivity, and arterial Wall structure in Wistar rats." Elservier **20**: 304-310.
- Capettini, L. S. A., S. F. Cortes and V. S. Lemos (2010). "Relative contribution of Enos and Nnos to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta." European Journal of Pharmacology **643**: 260-266.
- Castro-Moreno, P., P. J. Pardo, R. Hernández-Muñoz, J. J. López-Guerrero, L. Del Valle-Mondragon, G. Pastelín-Hernández, M. Ibarra-Barajas and R. Villalobos-Molina (2012). "Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin I-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR." Autonomic & Autacoid Pharmacology **32**: 61-69.
- Caughey, G. E., L. G. Cleland, P. S. Penglis, J. R. Gamble and M. J. James (2001). "Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2." The Journal of Immunology **167**: 2831-2838.
- Crowley, S. D., S. B. Gurley, M. J. Herrera, P. Ruiz, R. Griffiths, A. P. Kumar, K. Hyung-Suk, O. Smithies, T. H. Le and T. M. Coffman (2006). "Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**: 17985-17990.
- Das, R., M. G. Kravtsov, J. H. Ballard and C. Y. Kwan (1999). "L-NAME inhibits Mg<sup>2+</sup> -induced rat aortic relaxation in the absence of endothelium." British Journal of Pharmacology **128**: 493-499.

- Davis, M. E., I. M. Grumbach, T. Fukai, A. Cutchins and D. G. Harrison (2004). "Shear Stress Regulates Endothelial Nitric-oxide Synthase Promoter Activity through Nuclear Factor  $\kappa$ B Binding." The Journal of Biological Chemistry **279**: 163-168.
- De Caterina, R., P. Libby, P. Hai-Bing, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. a. Gimbrone, J. W. S. Shin and J. K. Liao (1995). "Nitric Oxide Decreases Cytokine-induced Endothelial Activation: Nitric Oxide Selectively Reduces Endothelial Expression of Adhesion Molecules and Proinflammatory Cytokines." Journal Clinical Investigation **96**: 60-68.
- Dias, R. G., C. E. Negrão and M. H. Krieger (2011). "Óxido Nítrico y Sistema Cardiovascular: Activación Celular, Reactividad Vascular y Variante Genética." Sociedad Brasileira de Cardiología **96**(1): 68-75.
- Dikalov, S. I. and R. R. Nazarewicz (2013). "Angiotensin II-Induced Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Potential Mechanisms and Relevance for Cardiovascular Disease." Antioxidants and Redox Signaling **19**: 1085-1094.
- Dora, K. A., M. P. Doyle and B. R. Duling (1997). "Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles." Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 6529-6534.
- Félétou, M., Y. Huang and P. M. Vanhoutte (2011). "Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products." British Journal of Pharmacology **164**: 894-912.
- Fitch, R. M., J. C. Rutledge, Y. X. Wang, A. F. Powers, J. L. Tseng, T. Clary and G. M. Rubangy (2006). "Synergistic effect of angiotensin II and nitric oxide synthase inhibitor in increasing aortic stiffness in mice." Journal Physiology Heart **290**: H1190-H1198.
- Förstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath and H. Kleinert (1994). "Nitric Oxide Synthase Isozymes, Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions." Hypertension **23**(2): 1121-1131.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**: 373-376.
- Gal, I. B., G. M. López, V. A. I. Martín and M. J. Prieto (2007). Bases de la Fisiología. Madrid, España.
- García, M. J. A. and C. J. J. Gómez-Reino (2000). "The physiopathology of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2." Revista Española de Reumatología **27**(1): 33-35.
- Geiselhöringer, A., M. Werner, K. Sigl, P. Smital, R. Wörner, L. Archeo, J. Stieber, P. Weinmeister, R. Feil, S. Feil, J. Wegener, F. Hofmann and J. Schlossmann (2004). "IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase." The EMBO Journal **23**: 4222-4231.
- Giovannitti, J. A., S. M. Thoms and J. J. Crawford (2015). "Alpha-2 Adrenergic Receptors Agonists: A Review of Current Clinical Applications." American Dental Society of Anesthesiology **62**: 31-38.
- Gonzalez, W., V. Fontaine, M. E. Pueyo, N. Laquay, D. Messika-Zeitoun, M. Philippe, A. Jean-François, M. P. Jacob and M. Jean-Baptiste (2000). "Molecular Plasticity of Vascular Wall During NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Induced

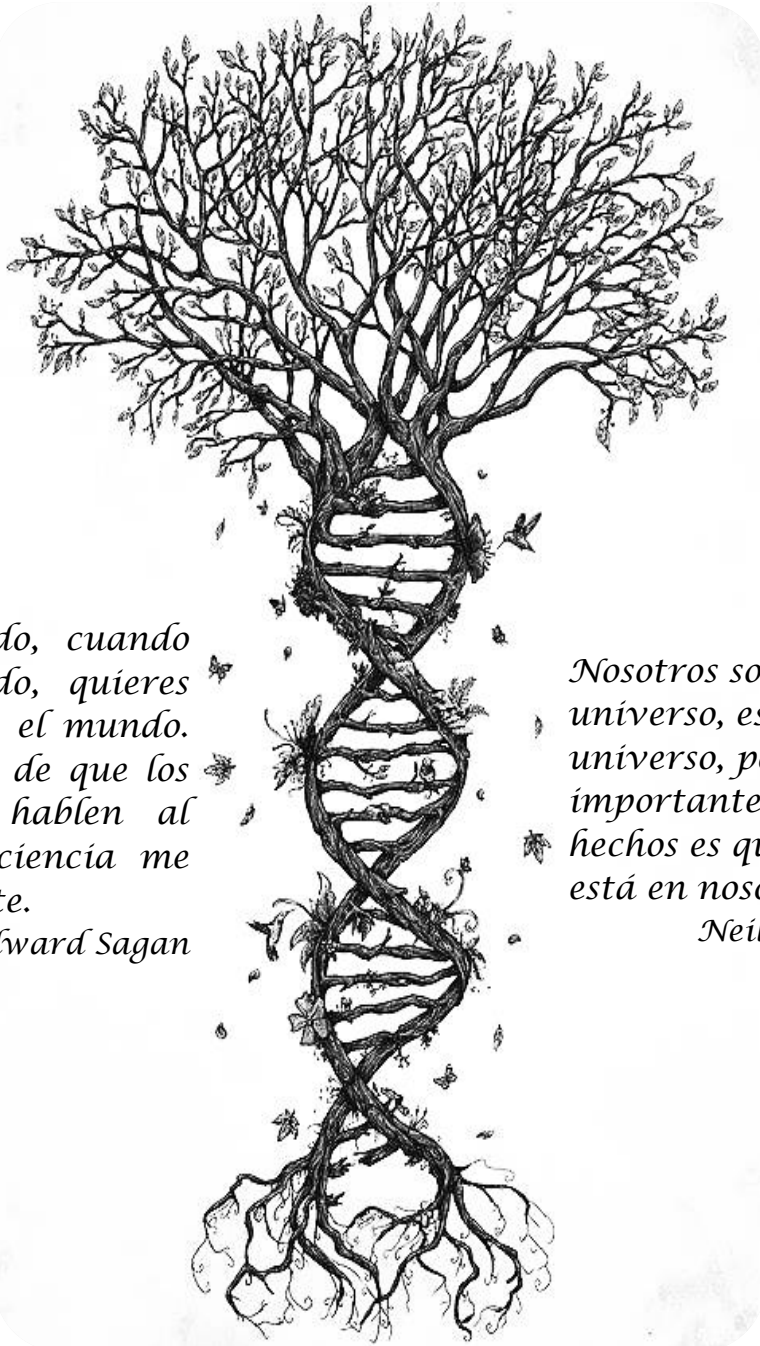
- Hypertension: Modulation of Proinflammatory Signals." Hypertension **36**: 103-109.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw and A. R. Wayne (1994). "Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells." Circ. Res. **74**: 1141-1148.
  - Grumbach, I. M., W. Chen, S. A. Mertens and D. G. Harrison (2005). "A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **39**: 595-603.
  - Gürdal, H., A. Can and M. Uğur (2005). "The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged  $\alpha$ 1-adrenergic receptor stimulation in rat thoracic aorta." British Journal of Pharmacology **145**(203-210).
  - Guyton, A. C. and J. E. Hall (2006). Tratado de Fisiología Médica.
  - Guzmán-Hernández, E. A., R. Villalobos-Molina, M. A. Sánchez-Mendoza, L. Del Valle-Mondragón, G. Pastelín-Hernández and M. Ibarra-Barajas (2015). "Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of N-nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension." Can. J. Physiol. Pharmacol **93**: 299-308.
  - Habib, S. and A. Ali (2011). "Biochemistry of Nitric Oxide." Association of Clinical Biochemists of India **26**(1): 3-17.
  - Hai-Bing, P., P. Libby and J. K. Liao (1995). "Induction and Stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  by Nitric Oxide Mediates Inhibition of NF- $\kappa$ B." The Journal of Biological Chemistry **270**: 14214-14219.
  - Harumi, T. C., R. G. Silva and G. R. Oliveira (2012). "Nitric Oxide in Skeletal Muscle: Role on Mitochondria Biogenesis and Function." International Journal of Molecular Sciences **13**(17160-17184).
  - Hofmann, F., H. H. W. Schmidt and J. P. Stasch (2009). Cgmp: Generators, Effectors and Therapeutic Implications.
  - Huang, A., D. Sun and A. Koller (2000). "Shear Stress-Induced Release of Prostaglandin H<sub>2</sub> in Arterioles of Hypertensive Rats." Hypertension **35**: 925-930.
  - Inoue, H., Y. Taba, Y. Miwa, C. Yokota, M. Miyagi and T. Sasaguri (2002). "Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Fluid Shear Stress in Vascular Endothelial Cells." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **22**: 1415-1420.
  - Jackson, W. F. (2000). "Ion channels and vascular tone. Hypertension." Journal of the American heart association **35**: 173-178.
  - Jean-François, A., E. A. Abdel-Ilah, G. Chatellier, J. Ménard and M. Jean-Baptiste (1993). "Cardiac Weight in Hypertension Induced by Nitric Oxide Synthase Blockade." Hypertension **22**: 380-387.
  - Jean-François, A., L. Warin and M. Jean-Baptiste (1992). "Determinants of Aortic Cyclic Guanosine Monophosphate in Hypertension Induced by Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthase." Journal Clinical Investigation **90**: 647-652.
  - Kanagy, N. L. (1997). "Increased vascular responsiveness to  $\alpha$ 2-adrenergic stimulation during NOS inhibition-induced hypertension." Journal Physiology Heart **273**(42): H2756-H2764.

- Khan, M. T., L. Wagner, D. Yule, C. Bhanumathy and S. K. Joseph (2006). "Akt Kinase Phosphorylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors." The Journal of Biological Chemistry **281**: 3731-3737.
- Kiritoshi, S., T. Nishikawa, K. Sonoda, D. Kukidome, T. Senokuchi, T. Matsuo, T. Matsumura, H. Tokunaga, M. Brownlee and E. Araki (2003). "Reactive Oxygen Species from Mitochondrial Induce Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Human Mesangial Cells: Potencial Role in Diabetic Nephropathy." Diabetes **52**: 2570-2577.
- Kirkby, N. S., M. V. Chan, A. K. Zaiss, E. Garcia-Vaz, J. Jiao, L. M. Berglund, E. F. Verdu, B. Ahmetaj-Shala, J. L. Wallace, H. R. Herschman, M. F. Gomez and J. A. Mitchell (2016). "Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF-B and NFAT transcriptional pathways." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**: 434-439.
- Kommareddy, M., R. M. McAllister, V. K. Ganjam, J. R. Turk and M. H. Laughlin (2011). "Upregulation of Cyclooxygenase-2 Expression in Porcine Macula Densa With Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition." National Institute of Health **48**: 1125-1133.
- Liu, B., W. Luo, Y. Zhang, H. Li, N. Zhu, D. Huang and Y. Zhou (2012). "Role of cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in endothelium-dependent vasoconstrictor activity of porcine interlobular renal arteries." Am. J. Physiol. Renal. Physiol **302**: F1133-F1140.
- Luvarà, G., M. E. Pueyo, M. Philippe, C. Mandet, F. Savoie, D. Herion and M. Jean-Baptiste (1998). "Chronic Blockade of NO Synthase Activity Induces a Proinflammatory Phenotype in the Arterial Wall: Prevention by Angiotensin II Antagonism. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology." Journal of the American Heart Association **18**: 1408-1416.
- Martínez-Revelles, S., M. S. Avendaño, A. B. García-Redondo, Y. Álvarez, A. Aguado, J. V. Pérez-Girón, L. García-Redondo, V. Esteban, J. M. Redondo, M. J. Alonso, A. M. Briones and M. Salices (2012). "Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension." Antioxidants & Redox Signaling **0**(1-15).
- Martínez, A. C., M. Hernández, S. Novella, M. P. Martínez, R. M. Pagán, C. Hermenegildo, A. García-Sacrista, D. Prieto and S. Benedito (2014). "Diminished Neurogenic Femoral Artery Vasoconstrictor Response in a Zucker Obese Rat Model: Differential Regulation of NOS and COX Derivatives." PLoS ONE **9**(9): 106-132.
- McAdam, B. F., F. Catella-Lawson, I. A. Mardini, S. Kapoor, J. A. Lawson and G. A. Fitzgerald (1999). "Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**: 272-277.
- Moncada, S., A. Higgs and F. R. S. M.D. (1993). "The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway." The new England Journal of medicine **329**(27): 2002-2012.
- Morinelli, T. A., L. P. Walker and M. E. Ullian (2008). "COX-2 expression stimulated by Angiotensin II depends upon AT1 receptor internalization in vascular smooth muscle cells." Biochimica et Biophysica Acta **1783**: 1048–1054.
- Mozaffarian, D., E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. d. Ferrant, J.-P. Després, H. J. Fullerton, V. J. Howard, M. D. Huffman, S. E. Judd, B. M. Kissela, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, S. Liu, R. H.



- Mackey, D. B. Matchar, D. K. McGuire, E. R. M. III, C. S. Moy, P. Muntner, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D. K. Pandey, M. J. Reeves, C. J. Rodriguez, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfghi, T. N. Turan, S. S. Virani, J. Z. Willey, D. Woo, R. W. Yeh and M. B. Turner (2015). "on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." Circulation **131**: e29–e322.
- Otero-Martínez, D., L. Otero-Pereiro and González-Fernandez (2014). "Análisis del comportamiento del material de la arteria aorta ascendente para su modelación." Ingeniería Mecánica **17**(2): 108-118.
  - Otero-Martínez, D., L. L. Otero-Pereiro and V. González-Fernandez (2014). "Análisis del comportamiento del material de la arteria aorta ascendente para su modelación." Ingeniería Mecánica **17**(2): 108-118.
  - Pohl, U., C. De Wit and T. Gloe (2000). "Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation." Acta Physiology Scandinavian **168**: 505-510.
  - Qu, C., S. W. S. Leung, P. M. Vanhoutte and R. Y. K. Man (2010). "Chronic Inhibition of Nitric-Oxide Synthase Potentiates Endothelium-Dependent Contractions in the Rat Aorta by Aumenting the Expression of Cyclooxygenase-2." The Journal of Pharmacology and Ezperimental Therapeutics **334**: 373-380.
  - Salud, O. M. d. I. (2013). Información general sobre la HIPERTENSIÓN en el mundo, Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Suiza.
  - Sandoo, A., J. J. C. S. V. v. Zanten, G. S. Metsios, D. Carroll and G. D. Kitas (2010). "The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone." The Open Cardiovascular Medicine Journal **4**(302-312).
  - Sayers, E. W., T. Barrett, D. A. Benson, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, R. Edgar, S. Federhen, M. Feolo, L. Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, D. Landsman, D. J. Lipman, T. L. Madden, D. R. Maglott, V. Miller, I. Mizrachi, J. Ostell, K. D. Pruitt, G. D. Schuler, E. Sequeira, S. T. Sherry, M. Shumway, K. Sirotkin, A. Souvorov, G. Starchenko, T. A. Tatusova, L. Wagner, E. Yaschenko and J. Ye (2009). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic Acids Res **37**: 5-15.
  - Schneider, J.-C., D. E. Kebir, C. Chéreau, S. Lanone, X.-L. Huang, A. S. R. Buys, J.-C. Mercier, J. Dall’Ava-Santucci and T. Dinh-Xuan (2003). "Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodilin-dependent protrin kinase II in endothelial NO Production and endothelium-dependent relaxation." American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology **284**: H2311-H2319.
  - Schricker, K., M. Hamann and A. Kurtz (1995). "Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of renin system." American Physiological Society **93**: F825-F830.
  - Seçilmiş, M. A., Ö. Y. Özü, O. E. Kiroğlu, E. Şingirik and K. Büyükafşar (2014). "The Production of vasoconstriction-induced residual No modulates perfusion pressure in rta mesenteric vascular bed." Perfusion **29**: 488-495.
  - Sekiguchi, F., Y. Miyake, S. Nakazumi, K. Shimamura, K. Yamamoto and S. Sunano (2001). "Difference in Effects of Strech on Depressive Effect of Endothelium-Derived Nitric Oxide on Noradrenaline-and High-K-linduced Contarctions between the Aorte from Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats." Journal Smooth Muscle Research **37**: 9-23.

- Smith, W. L., D. L. DeWitt and R. M. Garavito (2000). "Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology." Rev. Biochemistry **69**(145-182).
- Smith, W. L., Y. Urade and J. Per-Johan (2012). "Enzymes of the Cyclooxygenase Pathways of Prostanoid Biosynthesis." National Institutes of Health **111**(10): 5821-5865.
- Sosa-Luna, C. A., H. Astudillo-de la Vega, D. J. Sánchez-González, S. G. Martínez-Salas, R. Valdez-Espinosa, R. Villalobos-Molina and M. Ibarra-Barajas (2005). "Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vasculatura renal de rata hipertensas." REV SANID MILIT MEX **59**(1): 32-50.
- Suzuki, H., K. Eguchi, H. Ohtsu, S. Higuchi, S. Dhobale, G. D. Frank, E. D. Motley and S. Eguchi (2006). "Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by the Angiotensin II Type 1 Receptor." Endocrinology **147**: 5914-5920.
- Traub, O. and B. C. Berk (1998). "Laminar Shear Stress: Mechanisms by Which Endothelial Cells Transduce an Atheroprotective Force." Arterioscler Thromb Vasc Biol. **18**: 677-685.
- Tsamis, A., J. T. Krawiec and D. A. Vorp (2013). "Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review." journal of the royal society **10**(201-222).
- Villalba, I. N. (2010). Función del calcio en la regulación vascular peneana y su implicación en la vasculopatía diabética. doctor, Universidad Complutense de Madrid.
- Wong, M. S. and P. M. Vanhoutte (2010). "COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries." Acta Pharmacologica Sinica **31**: 1095-1102.
- Yang, D., M. Félétou, N. Levens, J. N. Zhang and P. M. Vanhoutte (2003). "A Diffusible Substance(s) Mediates Endothelium-Dependent Contractions in the Aorta of SHR." Hypertension **41**: 143-148.
- Zhao, Y., P. M. Vanhoutte and S. W. S. Leung (2013). "Endothelial Nitric Oxide Synthase-Independent Release of Nitric Oxide in Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **344**: 15-22.



*Después de todo, cuando estás enamorado, quieres contarlo a todo el mundo. Por eso la idea de que los científicos no hablen al público de la ciencia me parece aberrante.*

*Carl Edward Sagan*

*Nosotros somos parte del universo, estamos en este universo, pero quizá más importante que estos dos hechos es que el universo está en nosotros.*

*Neil deGrasse Tyson*

*El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre*

*Charles Darwin*