



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHÁVEZ"**

***"EXPRESIÓN RENAL DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 EN RATAS  
CON HIPERTENSIÓN DEPENDIENTE DE ANGIOTENSINA."***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:**

**NEFROLOGÍA**

**PRESENTA:**

***Dr. Héctor Guerrero Centeno.***

**TUTOR:**

***Dra. Rocío Bautista Pérez.***

***Dra. Martha Franco Guevara.***



**MÉXICO D.F. AGOSTO 2008.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

---

Dra. Martha Franco Guevara  
Jefe del Departamento de Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

---

Dr. Fernando Guadalajara Boo  
Director de Enseñanza e Investigación  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

---

Dra. Rocío Bautista Pérez  
Tutor de tesis.  
Investigador en Ciencias Médicas "D"  
Departamento de Nefrología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

---

Dra. Martha Franco Guevara  
Investigador en Ciencias Médicas "F"  
Departamento de Nefrología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

---

Dr. Héctor Guerrero Centeno  
Alumno de la Especialidad en Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

## ***Dedicatorias.***

***Martha: Gracias por lo que haz hecho. Gracias por enseñarme lo que es la vida, lo que es la alegría, por darme la dicha de ser padre. “Porque eres lo que yo esperaba, lo que tanto anhelaba y por fin encontré”. Te amo.***

***Daniela, Paola, Gael: Una sonrisa suya basta para iluminar mis días y son mi aliento para vivir.***

***Mamá, Papá: Porque su fuerza siempre esta a mi lado, porque su ejemplo vale más que mil palabras.***

***Consuelo, Claudia, Julia, Víctor: Gracias por su apoyo incondicional en los momentos difíciles.***

***Jesús, Alicia, Sandra, Paulina, Hugo: Gracias por cuidar lo más valioso que tengo.***

***A Dios: Gracias por permitirme tener esta familia y estos amigos.***

## ***Agradecimientos.***

***A mis compañeros, quienes me han alentado para seguir adelante.***

***A mis maestros que me enseñaron el camino y me impulsaron a seguirlo.***

***A mis pacientes, libro abierto para aprender medicina.***

***Dra. Rocío, Dra. Franco por su tiempo para la realización de esta tesis y la enseñanza que con ello me han dejado.***

***Al Instituto Nacional de Cardiología, por darme la oportunidad de realizar este sueño.***

## **INDICE.**

<b>Resumen.</b>	<b>6</b>
<b>Antecedentes.</b>	<b>8</b>
Figura 1.	20
Figura 2.	21
<b>Justificación.</b>	<b>22</b>
<b>Hipótesis.</b>	<b>22</b>
<b>Objetivo.</b>	<b>22</b>
<b>Diseño del estudio.</b>	<b>22</b>
<b>Materiales y métodos.</b>	<b>23</b>
<b>Resultados.</b>	<b>29</b>
Figura 3.	30
Figura 4.	31
Figura 5.	32
<b>Discusión.</b>	<b>33</b>
<b>Conclusiones.</b>	<b>37</b>
<b>Referencias.</b>	<b>38</b>

## **RESUMEN.**

Se ha reportado que los nucleótidos ATP, ADP y AMP tienen efecto parácrino en diversos tejidos predominantemente el músculo liso vascular y el riñón. Estos nucleótidos se unen a receptores purinérgicos P2, que se dividen en P2X y P2Y. Recientemente los receptores purinérgicos han sido motivo de estudio para determinar su participación en la fisiopatología del daño renal en hipertensión arterial (HTA), ya que cambios en la expresión de estos receptores pueden alterar la respuesta vascular renal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de los receptores P2X1 y P2Y1 a nivel de proteína y RNAm en el riñón de animales con hipertensión dependiente de Angiotensina II. Para ello se utilizaron ratas Wistar macho de 300-350 g de peso, se dividieron en 2 grupos: control e hipertensión inducida por la administración de angiotensina II. La hipertensión se indujo por medio de una bomba miniosmótica por vía subcutánea, (435 ng/kg/min Ang II por 14 días); al final de la infusión se extrajo el riñón el cual se separó en corteza y médula, el tejido se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la determinación de la expresión de los receptores P2X1 y P2Y1 a nivel de proteína y RNAm por Western blot y RT-PCR respectivamente. La presión arterial al día 14 fue de  $110.5 \pm 1.7$  y  $185 \pm 3.8$  mmHg para el grupo control y con hipertensión respectivamente ( $p < 0.05$ ). La proteinuria fue de  $9.90 \pm 0.22$  control vs  $122.2 \pm 1.74$  mg/24 hrs. HTA. La expresión del receptor P2X1 a nivel de proteína aumentó en la corteza de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control ( $0.9322 \pm 0.01$  HTA vs  $0.6983 \pm 0.04$  receptor/actina unidades arbitrarias [UA] del control); en cambio no se observaron cambios en la expresión del receptor P2Y1

entre ambos grupos experimentales ( $0.8008 \pm 0.01$  HTA vs  $0.8544 \pm 0.01$  receptor/actina UA control). La expresión del receptor P2X1 ( $0.8882 \pm 0.02$  HTA vs  $0.8896 \pm 0.03$  receptor/actina UA control) y P2Y1 ( $0.8724 \pm 0.06$  HTA vs  $0.9512 \pm 0.01$  receptor/actina UA control) no se modificó el nivel de proteína en la médula de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control. La expresión del receptor P2X1 a nivel de RNAm disminuyó en la corteza de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control ( $0.8208 \pm 0.008$  HTA vs  $0.9247 \pm 0.01$  receptor/actina UA control) mientras que no se observaron cambios en la expresión del receptor P2Y1 entre ambos grupos experimentales ( $0.7935 \pm 0.02$  HTA vs  $0.8544 \pm 0.01$  receptor/actina UA control). La expresión del receptor P2X1 a nivel de RNAm disminuyó ( $0.8182 \pm 0.02$  HTA vs  $0.9095 \pm 0.02$  receptor/actina UA control) y del P2Y1 no se modificó ( $0.7838 \pm 0.02$  HTA vs  $0.8614 \pm 0.02$  receptor/actina UA control) en la médula de ninguno de los grupos. Estos resultados sugieren que cambios en la expresión del receptor P2X1 pueden participar en el daño renal la hipertensión dependiente de angiotensina II.



## **ANTECEDENTES**

### **Hipertensión arterial.**

La hipertensión arterial constituye un grave problema de salud pública por su alta relevancia y por la gravedad de sus complicaciones tardías (1,2, 3), por lo que el estudio de la patogenia de la hipertensión arterial adquiere gran relevancia. En los Estados Unidos de Norteamérica (1) según el NHANES, aproximadamente de 29 a 31% de los individuos mayores de 18 años son hipertensos lo cual indica que existen aproximadamente 58 a 65 millones de hipertensos, con un incremento en el número de pacientes en los últimos años (2, 3).

En México la encuesta nacional de salud del 2000 y en la Re-encuesta nacional de hipertensión (RENAHTA) (4, 5) identificaron la prevalencia de hipertensión arterial y su relación con varios factores de riesgo cardiovascular; el diagnóstico de HAS se basó en un diagnóstico médico previo con toma de antihipertensivos, o una TA mayor de 140 mmHg de presión sistólica y/o 90 mmHg de diastólica. Las muestras se ponderaron de acuerdo a los resultados del INEGI. La prevalencia de HAS en México de manera global fue de 30.05%; en relación al género, 34.2% fueron del sexo masculino y 26.3% del sexo femenino. Estos resultados demostraron un incremento relacionado en forma proporcional a la edad, así en individuos mayores de 50 años la prevalencia de hipertensión superó el 50%. Además se demostró la existencia de un diagnóstico tardío, ya que el 61% de la población con hipertensión se diagnosticó durante la encuesta. Este último dato es muy importante, ya que indica que la mitad de los hipertensos en México ignoran que padecen la enfermedad, además refleja el escaso control que se tiene sobre el tratamiento, ya que solo del 14.6 al 20% de los pacientes se encontraron

controlados. Los factores de riesgo que más se relacionaron con hipertensión fueron el tabaquismo, la diabetes y la obesidad en orden creciente. La mayor prevalencia (34%) se observó en los estados del norte de la República.

### **Factores de riesgo:**

Además de las diferencias étnicas y los factores genéticos (6), uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de hipertensión arterial es la ingestión alta de sal, así como el consumo de alcohol, con el que existe una clara asociación. La obesidad se asocia con un incremento en la prevalencia e incidencia de hipertensión que se observa conforme avanza la edad (7). La dislipidemia también se ha asociado al desarrollo de hipertensión y es independiente de la obesidad. Y es frecuente observar hipertensión en pacientes con ciertas personalidades como la actitud hostil o en respuesta a el estrés (8).

Por otra parte las complicaciones de la hipertensión se asocian al grado de control de la misma (9). La hipertensión es el mayor factor de riesgo para el desarrollo temprano de enfermedad cardiovascular, más que el tabaquismo, la dislipidemia o la diabetes (10, 11, 12). Además, se ha observado que la hipertensión arterial aumenta el riesgo de falla cardíaca en todas las edades (11). Al respecto, la hipertrofia ventricular es un problema común en pacientes con hipertensión arterial y se ha asociado con un incremento en la incidencia de falla cardíaca, arritmias ventriculares y muerte súbita (13, 14, 15).

Es bien conocido que la hipertensión es el factor de riesgo más importante para desarrollo de accidente vascular cerebral, incluso la incidencia del mismo se ve disminuida con el uso de una terapia antihipertensiva efectiva (16, 17).

La hipertensión arterial es la segunda causa de insuficiencia renal y un factor muy importante que acelera la progresión del daño renal en enfermedades de diversa etiología, como la diabetes mellitus, las nefropatías primarias y las secundarias (18, 19, 20).

Se ha demostrado ampliamente que el riñón tiene un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial, tanto por alteraciones en la reabsorción a nivel tubular, como por alteración de los mecanismos intrarrenales como la natriuresis de presión y la actividad del sistema renina angiotensina intrarrenal.

### **El riñón en la hipertensión.**

Una de las hipótesis más importantes sobre la generación de la hipertensión arterial se basa en la existencia de una anomalía de la función renal. Si esta alteración es la causa o el resultado sigue siendo un tema de controversia, sin embargo, la evidencia científica señala al riñón como responsable del control de la presión arterial sistémica, así como la génesis y mantenimiento de la hipertensión arterial (21, 22). La principal evidencia que el riñón interviene directamente en el origen y mantenimiento de la hipertensión se demostró en cepas de ratas espontáneamente hipertensas (hipertensión genética), en las que se realizó trasplante cruzado de riñón con ratas normotensas, las ratas normotensas desarrollaron hipertensión, en cambio las ratas espontáneamente hipertensas normalizaron su presión arterial (23, 24, 25). Estos hallazgos también se han corroborado en humanos, quienes al recibir un trasplante de un familiar

hipertenso requirieron de una mayor cantidad de antihipertensivos que los pacientes que se trasplantan de un familiar normotenso (26).

Las alteraciones en el mecanismo de natriuresis de presión generan hipertensión. Normalmente existe una relación entre la excreción de sodio-agua y la presión de perfusión renal. Cuando existen alteraciones de la función renal, para mantener una excreción de sodio y agua dentro de límites normales se requiere de una presión de perfusión renal mayor, por lo que se eleva la presión arterial para mantener una presión de perfusión elevada. Entre los factores que desvían la curva de natriuresis de presión se encuentran: la angiotensina II, un aumento de la resistencia aferente (27, 28), disminución del coeficiente de ultrafiltración y el daño túbulointersticial (29, 30, 31).

### **Sistema Renina Angiotensina (SRA).**

El riñón y el sistema renina angiotensina juegan un papel fundamental en el desarrollo de hipertensión arterial. Se ha demostrado que la exposición temporal a angiotensina II produce hipertensión arterial permanente (32). Cuando se induce hipertensión arterial por oclusión de una arteria renal, el riñón afectado libera grandes cantidades de renina y angiotensina produciendo hipertensión aguda; la liberación de la oclusión en forma temprana normaliza la presión arterial. Sin embargo, cuando la oclusión permanece por tiempo prolongado, ocurren cambios en el riñón contralateral que hacen que la hipertensión persista, aún después de librar la oclusión.

En el riñón, la Ang II participa en la regulación de la hemodinámica renal, a través del efecto vasoconstrictor sobre las arteriolas aferente y eferente,

modificando el flujo sanguíneo renal (FSR), la presión glomerular, el coeficiente de ultrafiltración glomerular, que en conjunto disminuyen la filtración glomerular (33, 34). Por otra parte, la angiotensina II es uno de los moduladores más importantes del sistema de retroalimentación túbulo glomerular; este sistema traduce las concentraciones de cloruro de sodio presentes a nivel de las células de la macula densa a una respuesta vasodilatadora o vasoconstrictora de las arteriolas aferente y eferente (34, 35, 36). La respuesta del mecanismo de retroalimentación túbuloglomerular a Ang II se lleva a través de la activación de los receptores AT1; por inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de dichos receptores en la macula densa y con el uso de bloqueadores específicos para los receptores AT1 la respuesta se atenúa (37)

La angiotensina II además de participar en la regulación del tono vascular y la excreción renal de sodio, también tiene efectos parácrinos y autócrinos (38); regula el crecimiento, proliferación e hipertrofia de las células renales mesangiales, incrementa la expresión de proteínas de la matriz extracelular tales como laminina, colágena y fibronectina; también mediante la regulación de proteasas inhibitoras, como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas y PAI-1, genera una menor degradación de matriz extracelular. A nivel túbulointersticial, la angiotensina II tiene la capacidad de promover la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos favoreciendo el desarrollo de fibrosis. Además la Ang II activa las células inflamatorias estimulando la quimiotaxis y la producción de mediadores proinflamatorios. Mediante su unión a receptores AT1, activa diferentes factores de transcripción como la PA-1, el NF- $\kappa$ B. Las principales vías de señalización

activadas son la PKC, MAPK, PTK y enzimas como NADH, XO, COX, SOD, CAT, que participan en la regulación del estrés oxidativo. El resultado final de la estimulación de estas vías de señalización y factores nucleares es la producción y activación del sistema del TGF- $\beta$  que contribuye al daño renal.

### **Adenosín trifosfato.**

El ATP está ampliamente distribuido en las células (39); casi cualquier mecanismo fisiológico que requiera energía la obtiene de manera directa del ATP o algún otro nucleótido (por ejemplo GTP) (40). El ATP tiene un efecto parácrino, que regula procesos tan diversos como la neurotransmisión y la modulación de tono vascular (41, 42, 43, 44).

El ATP que se libera a partir de las células, puede ser hidrolizado en el intersticio por ectoenzimas lo que regula la concentración extracelular de ATP, o bien, unirse a receptores específicos (45, 46, 47). En el espacio extracelular el ATP y sus metabolitos pueden actuar de manera autócrina o parácrina en la macula densa, el glomérulo y las arteriolas aferente y eferente, así como en la luz tubular (48).

### **Receptores purinérgicos.**

Los receptores purinérgicos han sido clasificados en dos tipos: P1 y P2. Los receptores P1 tienen mayor afinidad por AMP y adenosina, en tanto que los receptores P2 tienen mayor afinidad por el ATP y el ADP (49, 50).

Los receptores purinérgicos P1 comprende 4 subtipos: A1, A2a, A2b y A3. Los receptores P2 se han clasificado en P2X y P2Y. La familia P2X se subdividen

a su vez en 7 subtipos: P2X1-7. Los receptores P2Y se subdividen en: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14, (51, 52).

### **Mecanismo de señalización de los receptores purinérgicos.**

Los receptores A1 y A3 se acopla a la proteína  $G_0/G_1$  produciendo inhibición de la adenilato ciclasa con disminución de AMP, en tanto que los receptores A2a y A2b se acoplan a la proteína  $G_s$ , lo cuál estimula a la adenilato ciclasa. Estos receptores al influir de manera negativa o positiva sobre la adenilato ciclasa actúan sobre la liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico y con ello induce la contracción vascular (51, 52).

El receptor P2X es un canal catiónico no selectivo permeable al  $Ca^{++}$ , el ATP se une al asa externa de este canal lo cual permite la entrada de  $Ca^{++}$  y  $Na^+$  al citosol así como la salida de  $K^+$  (51, 52).

Los receptores P2Y, son receptores con siete regiones transmembranales, que se acoplan a proteínas G. Los subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 se acoplan a proteínas Gq con lo cual se activa a la fosfolipasa C (PLC) aumentando por este mecanismo la concentración citosólica de  $Ca^{++}$ . En algunos epitelios, la unión a Gq también regula indirectamente a AMPc afectando otras funciones celulares a través de la activación de la fosfolipasa A2 ( $PLA_2$ ) con la subsecuente producción y liberación de prostaglandina E2 (PGE2). En tanto que los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 se acoplan a la proteína  $G_i$  con lo cual se inhibe a la adenilato ciclasa y disminuyen los niveles de AMPc (51, 52). Los receptores P2Y a nivel vascular tiene una respuesta bifásica, ya que son capaces producir vasodilatación y vasoconstricción, la primera por incremento en la liberación de

vasodilatadores endoteliales como el óxido nítrico y la prostaglandina I; la vasoconstricción es mediada por un incremento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular y/o por la activación de Rho cinasas (51, 52).



**Tabla 1: Mecanismo de señalización de los receptores purinérgicos P2 y afinidad a nucleótidos (53).**

<b>Receptor</b>	<b>Afinidad (mayor a menor)</b>	<b>Mecanismo de acción.</b>
P2X1	ATP	Canal de cationes Ca <sup>++</sup> y Na <sup>+</sup> .
P2X2	ATP	Canal de iones (particularmente Ca <sup>++</sup> ).
P2X3	ATP	Canal de cationes
P2X4	ATP	Canal de iones (particularmente Ca <sup>++</sup> ).
P2x5	ATP	Canal de iones.
P2X6	ATP	Canal de iones.
P2X7	ATP	Canal de iones.
P2Y1	ADP y ATP	Gq/G <sub>11</sub> PLC- β (aumenta).
P2Y2	ATP	Gq/G <sub>11</sub> (G1/G0) PLC- β (aumenta).
P2Y4	UTP	Gq/G <sub>11</sub> (G1?) PLC- β (aumenta).
P2Y6	UDP, UTP, ADP	Gq/G <sub>11</sub> (G1/G0) PLC- β (aumenta).
P2Y11	ATP y ADP	Gq/G <sub>11</sub> y GS: PLC-β (aumenta).
P2Y12	ADP y ATP	G <sub>i</sub> /otros.
P2Y13	ADP y ATP	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> /otros.
P2Y14	UDP glucosa, UDP galactosa	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> /otros.

**Tabla 2: Localización de los receptores purinérgicos (51).**

**A nivel sistémico:**

- P2X:
- 1 Músculo liso, plaquetas, cerebelo, espina dorsal
  - 2 Músculo liso, SNC, retina, células cromafín, ganglios autonómicos.
  - 3 Neuronas sensitivas, algunas neuronas simpáticas.
  - 4 SNC, testículo, colon.
  - 5 Células proliferativas en piel, intestino, vejiga, timo y espina dorsal.
  - 6 SNC, neuronas motoras en cordón espinal.
  - 7 Células apoptóticas (inmunes, páncreas, piel).
- P2Y:
- 1 Células epiteliales y endoteliales, plaquetas y células inmunes.
  - 2 Células inmunes, epiteliales y endoteliales, túmulos renales y osteoblastos.
  - 4 Células endoteliales.
  - 6 Algunas células de epitelio, placenta, células T y timo.
  - 11 Bazo, intestino, granulocitos.
  - 12 Plaquetas, células gliales.
  - 13 Bazo, cerebro, ganglios linfáticos. médula ósea.
  - 14 Placenta, tejido adiposo, estomago, intestino, algunas regiones del cerebro

### **A nivel renal:**

<b>P2X:</b>	1	Arteriola aferente.
	2	Arteriola aferente.
	3	-----
	4	TCP, TPPR, SDAH, PDAAH, PGAH, TCD, TCC, CCMI, CCME.
	5	PGAH, TCD, TCC, CCMI, CCME.
	6	TCP, TPPR, SDAH, PDAAH, PGAH, TCD, TCC, CCMI, CCME.
	7	-----
<b>P2Y:</b>	1	Arteriola aferente, glomérulo.
	2	Arteriola aferente, glomérulo, PGAH, CCMI, CCME.
	4	TCP, TPPR.
	12	Mesangio glomerular.

*Abreviaturas.* TCP: túbulo contorneado proximal; TPPR: túbulo proximal porción recta; SDAH: segmento descendente asa de Henle; PDAAH: porción delgada ascendente del asa de Henle; PGAH: porción gruesa del asa de Henle; TCD: túbulo contorneado distal; TCC: túbulo colector cortical; CCMI: conducto colector médula interna; CCME: conducto colector médula externa.

### **Función de los receptores purinérgicos en el riñón.**

En el riñón, los receptores P2X y P2Y se expresan tanto en la membrana apical como en la membrana basolateral de las células epiteliales, así como en los vasos renales, las células del mesangio glomerular y los podocitos (49, 50, 51). Se ha sugerido que la activación de los receptores P2 regulan la hemodinámica renal

y el transporte a nivel tubular (51, 54, 55, 56, 57, 58).

Recientemente se ha sugerido que el ATP o su metabolito la adenosina participan como mediadores de la señal de la macula densa a las arteriolas aferente y eferente que regula la filtración glomerular (39, 59, 60, 61, 62).

A este respecto, el grupo del Dr. Navar y cols. (63) han propuesto la participación del ATP en las alteraciones renales que se observan en la hipertensión arterial. Estos autores reportan que en el modelo de hipertensión inducida con Ang II, el bloqueo de los receptores P2Y no modifica la presión arterial, ni el contenido de renina o de Ang II intersticial; en cambio disminuyó la expresión de alfa actina en las células mesangiales, la lesión de la arteriola aferente, la proliferación de células tubulares, así como la infiltración de macrófagos, estos resultados sugieren que además de la actividad vascular y sus efectos en la hemodinámica glomerular, los receptores purinérgicos pudieran contribuir en la infiltración túbulointersticial y la hipertrofia de la arterial aferente observada en este modelo (63).

El ATP extracelular es un poderoso agente parácrino que ejerce efectos agudos y crónicos a través de la activación de uno o varios miembros de la familia de receptores purinérgicos P2 (64, 65, 66). Es bien conocido que las células endoteliales liberan nucleótidos endógenos, incluyendo ATP (67).

Además se ha demostrado que el ATP en el líquido intersticial renal aumenta en respuesta a la elevación de la presión arterial (39, 61, 64, 68) y regula la resistencia vascular renal en forma similar que la adenosina (32, 39, 61, 64, 68); cuando el ATP se eleva en forma sostenida actúa como un agente proliferativo, capaz de inducir hipertrofia del músculo liso vascular e hiperplasia (66, 69, 70); en

el riñón, estos efectos son mediados por receptores purinérgicos P2X y P2Y que se encuentran presentes en los vasos renales (71, 72).

Los resultados previamente mencionados nos indican la relevancia de los receptores purinérgicos (P1 de adenosina y P2Y de ATP) en las alteraciones de la función renal que se observan en la hipertensión inducida por Ang II. Por lo que es importante determinar si la adenosina y el ATP o la degradación de ATP a adenosina son los responsables de las alteraciones de la función renal observada en hipertensión. La participación de la adenosina ha sido recientemente demostrada en nuestro laboratorio (32), el siguiente paso es determinar la participación del ATP, lo que nos permitirá proponer un nuevo mecanismo celular para prevenir y/o disminuir la lesión renal.

Es importante mencionar que se ha descrito la presencia de receptores P2X y P2Y en la microcirculación renal, el mesangio, así como a nivel tubular, sin embargo sus implicaciones funcionales se conocen parcialmente (73).

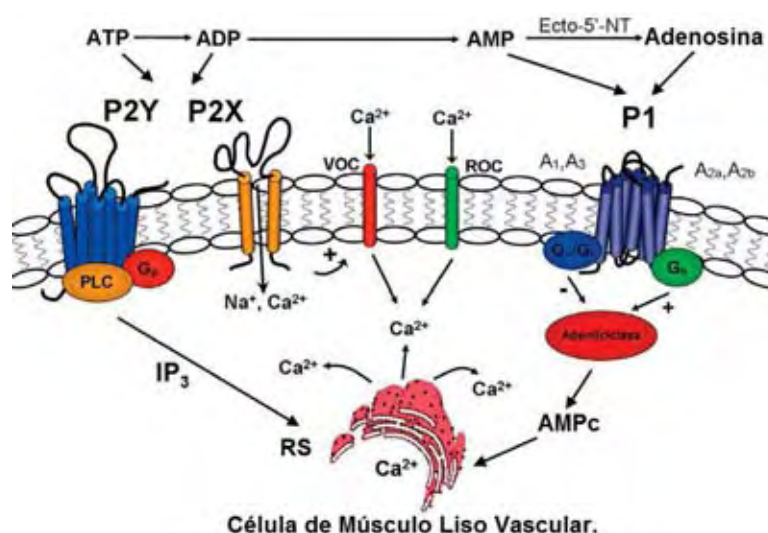
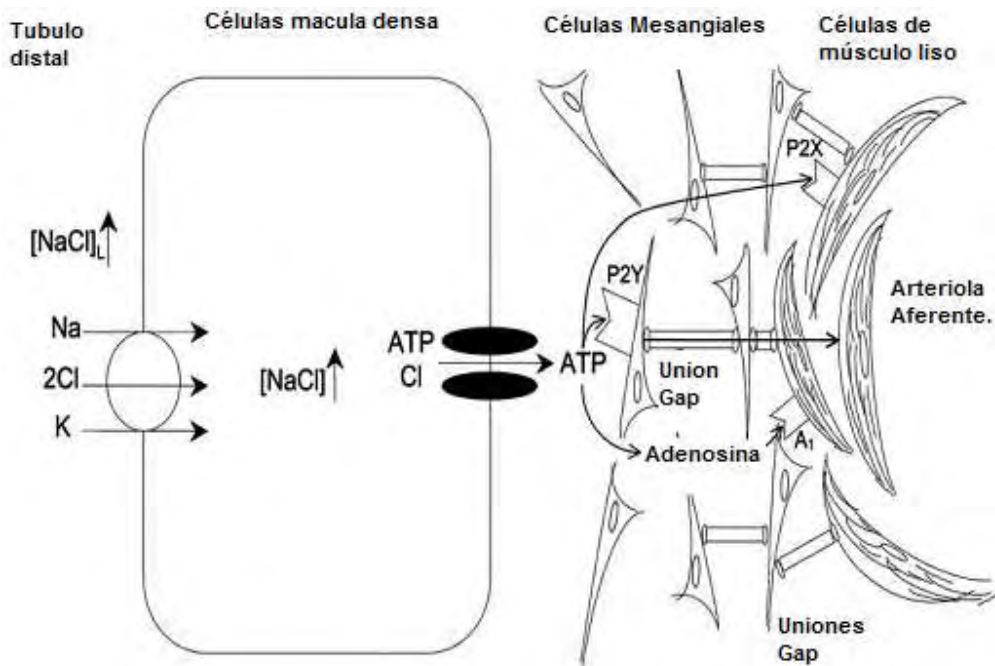


Figura 1

Recientemente, se ha reportado que en la hipertensión inducida por Ang II, la concentración de adenosina aumenta en el plasma, en el tejido renal, así como a nivel intersticial en la corteza renal, lo cual contribuye con la vasoconstricción renal que se observa en la hipertensión dependiente de Ang II (74, 75).



**Figura 2. Mecanismo por el que ATP es liberado de las células de la macula densa y estimula a las células de musculo liso vascular, mediante su unión a receptores de P2X y P2Y.**

### **III. JUSTIFICACIÓN.**

El estudio de la interacción entre la AngII y los nucleótidos permitirá entender la fisiopatología de la vasoconstricción renal que se observa en la hipertensión dependiente de AngII. El presente proyecto, nos permitirá contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción del sistema purinérgico (ATP y receptores) a nivel renal en hipertensión arterial, así como proponer nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento del daño renal en hipertensión

### **IV. HIPÓTESIS**

En el riñón de ratas con hipertensión dependiente de Ang II se inducen cambios en la expresión de los receptores purinérgicos P2X1 y P2Y1 esto puede modificar la microcirculación renal, lo cual puede contribuir al desarrollo del daño renal en hipertensión.

### **V. OBJETIVO.**

Evaluar la expresión de los receptores P2X1 y P2Y1 a nivel de proteína y RNAm en el riñón de animales con hipertensión dependiente de Angiotensina II.

### **VI. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Se trata de un estudio experimental, prospectivo, longitudinal, abierto.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Modelo Experimental.**

Se indujo hipertensión arterial mediante la administración de Ang II a través de una bomba miniosmótica (435 ng/kg/min), que se colocó en el tejido subcutáneo del dorso del animal por 14 días. Se determinó la presión arterial cada semana. A los 14 días se recolectó la orina por 24 hrs para evaluar proteinuria. Al grupo de animales control se les efectuó la cirugía ficticia (73, 76).

### **Registro de Presión Arterial.**

Se midió la presión arterial sistólica en ratas conscientes, colocadas en una jaula de restricción y mediante pletismografía con un manguillo colocado en la cola de la rata, el trazo se graficó en un polígrafo (Narco Biosystems USA).

### **RT-PCR.**

La RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*; Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto RNAm como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a DNAc, que es posteriormente amplificado. La amplificación de DNA permite la multiplicación exponencial de unas pocas moléculas diana de DNA hasta  $10^6$  copias con una alta especificidad.



### **Aislamiento de RNA.**

Para que se lleve a cabo la disociación del complejo nucleoproteico, se homogenizó 100 mg de corteza de riñón con 1 ml de trizol y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente cada incubación y centrifugación se llevó a cabo a 4°C. Después de la disociación de l complejo nucleoproteico se adicionó 200 µl de cloroformo, se incubó por 34 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos, posteriormente se tomaron 500 µl de la fase acuosa y se le adicionó 500 µl de isopropanol (para precipitar el RNA), se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 75% para lavar la pastilla de RNA, se centrifugó a 7,500 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante. Finalmente se resuspendió la pastilla de RNA en 30 µl de agua DEPC (0.1%). De la solución anterior se tomaron 5 µl y se le adicionó 495 µl de agua DEPC para tomar lecturas en el espectrofotómetro a 260/280 nm (UV). La relación  $A_{260/280 \text{ nm}}$  nos indica el grado de pureza, si la relación es menor de 1.8 indica contaminación con proteínas, también se determinó la concentración RNA. Para determinar la integridad del RNA se colocó en un gel de agarosa al 1%, 2 µg de RNA en 2µl de amortiguador de muestra y se corrió a 70 volt por 40 minutos en la presencia del amortiguador TAE. El gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (UV). Se observó la presencia de RNA total: RNAr (28S y 18S), RNAt y RNAm. Para la digestión de DNA en muestras de RNA se incubó a 37°C por 15 minutos: 2 µg de RNA, 1 µl de amortiguador [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>], 1 µl de DNAasa, el volumen se ajustó a 10 µl con agua DEPC (0.1%). Se inactivo la enzima a 65°C por 15 minutos.

### **Retrotranscripción inversa.**

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes: 10  $\mu\text{l}$  RNA (2  $\mu\text{g}$ ) tratado con DNAasa, 1  $\mu\text{l}$  de oligo dt (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  amortiguador (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 2  $\mu\text{l}$  de 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{l}$  de 10 mM dNTP, 2  $\mu\text{l}$  de 0.1 M DTT, 1  $\mu\text{l}$  de superscript RT, se incubó a 42°C por 50 minutos, se inactivó a la enzima a 70°C por 15 minutos, 4°C por 15 minutos. Posteriormente se adicionó 1  $\mu\text{l}$  de RNAasa H (2 unidades) y se incubó a 37°C por 20 minutos. El control negativo se realizó con los componentes de la mezcla antes indicados, excepto superscript RT y posteriormente se realizó la PCR.

### **Reacción de Cadena Polimerasa (PCR).**

Los "primer" se diseñaron tomando en cuenta las siguientes características: son específicos de la secuencia blanco, el largo es de 19-25 nucleótidos, presentan del 45-60% en GC, se evitaron repeticiones mayores de tres bases, el extremo 3' terminal es G ó C / GC, la temperatura de alineamiento es similar para el par de "primer", la secuencia de ambos "primers" no son complementarias por lo tanto no hibridan con ellos mismos o entre ellos.

Los "primer" específicos de la secuencia blanco son (número de acceso en GenBank):

Sentido P2rx1	GACCCCTCAGCAGACTCAAG
Antisentido P2rx1	GCCATTCACCTCCTCTACCA
Sentido P2ry1	AGCTGCCTGAGTTGGAAAGA
Antisentido P2ry1	GCCAGAGCCAAATTGAACAT

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes: 2.5  $\mu$ l amortiguador (200 nM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 1.5  $\mu$ l de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ l de 10 mM dNTP, 0.5  $\mu$ l primer sentido 10  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l primer antisentido 10  $\mu$ M, 0.25  $\mu$ l Taq DNApol (platinum Taq, 2-5 unidades/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l cDNA y 18.25  $\mu$ l agua deionizada estéril. La mezcla de reacción así como las muestras permanecieron en hielo hasta iniciar la reacción bajo las siguientes condiciones en el termociclador Perkin Elmer 2400: predesnaturalización (94°C por 2 minutos), 35 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), alineamiento (64°C por 1 minuto) y extensión (72° C por 1 minuto). Un ciclo de extensión final (72°C por 10 minutos).

Se mezcló 2.5  $\mu$ l del producto de PCR con 2.5  $\mu$ l de amortiguador de muestra [Glicerol 5% (v/v), Na<sub>2</sub>EDTA • 2H<sub>2</sub>O 10 mM, SDS 0.1% (w/v), azul de bromofenol 0.01% (w/v)] y se colocó en un gel de agarosa 2%, el cuál se corrió a 70 volt por 40 minutos en presencia del amortiguador TBE (Tris base 100 mM, ácido bórico 90 mM, Na<sub>2</sub>EDTA • 2H<sub>2</sub>O 1 mM, pH 8.3). El gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (UV).

### **Determinación de proteínas por el método de Bradford.**

Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina de 0 a 25 µg en 100 µl de solución PBS y se adicionó 900 µl del reactivo de azul de Coomassie G250, se mezcló evitando la formación de espuma. Las muestras se leyeron a 595 nm después de 2 minutos y antes de una hora de haber preparado las muestras.

Para determinar la concentración de proteínas del homogenado y de la suspensión de membranas se realizaron tres diluciones por triplicado: 1:50, 1:100 y 1:150. De estas diluciones se tomaron 100 µl y se adicionó 900 µl del reactivo de azul de Coomassie G250, se leyeron a 595 nm (espectrofotómetro Beckman DU\* 650).

### **Western Blotting.**

Se utilizaron 100 µg de proteína del homogenado y se resuspendió en el amortiguador para muestra (1:1 v/v (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol y 10% mercaptoetanol), las muestras se calentaron a  $\approx 80^\circ$  C por 5 minutos, después de 5 minutos en hielo se colocaron en un gel desnaturante de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se corrió en presencia del amortiguador de corrida (0.025 M Tris, pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS) a 100 volt. Se realizaron dos geles para electroforesis, un gel fue teñido con azul de coomassie (0.025% azul de coomassie R-250, 40% metanol y 7% ácido acético) para la detección de proteínas y el otro para llevar a cabo la transferencia. La transferencia se llevó a cabo en un sistema Trans-Blot SD (BioRad) a 10 volts por 30 minutos. Se utilizó nitrocelulosa (tamaño de poro de 0.45 µm, Bio Rad) y el

amortiguador de transferencia contenía: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol. Posteriormente se incubó la membrana con el amortiguador de bloqueo (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% leche) a 4° C toda la noche. La membrana se incubó con el anticuerpo primario contra P2X1, P2Y1 y actina (1:1000) a 4° C toda la noche. Después la membrana se incubó con el anticuerpo secundario HRP(1:3000) a temperatura ambiente por 1 hora. Para la detección de la proteína se utilizó un Kit de quimioluminiscencia (Amerrsham Pharmacia Biotech).

#### **Análisis estadístico.**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  EEM. Para evaluar la significancia de las medias de los grupos se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni, las diferencias se consideraron significativas cuando se obtuvo una  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS.

La presión arterial se elevó con la administración de Angiotensina II, de una presión basal de  $110.5 \pm 3.7$  mmHg a  $185 \pm 4.8$  mmHg en día 14; en los animales con cirugía ficticia (control) la presión fue de  $115 \pm 2.8$  y se mantuvieron normotensos (Figura 3A). La determinación de proteínas urinarias en la recolección de 24 hrs fue de  $9.90 \pm 0.220$  mg/24 hrs. en el grupo control, en cambio en el grupo con infusión de Ang II se elevó significativamente a  $122.2 \pm 17.4$  mg/24 hrs ( $p < 0.05$ ) (Figura 3B). La expresión del receptor P2X1 a nivel de proteína aumentó en la corteza de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control ( $0.9322 \pm 0.01$  HTA vs  $0.6983 \pm 0.04$  receptor/actina UA control) mientras que no se observaron cambios en la expresión del receptor P2Y1 entre ambos grupos experimentales ( $0.8008 \pm 0.01$  HTA vs  $0.8544 \pm 0.01$  receptor/actina UA control) (Figura 4A). La expresión del receptor P2X1 ( $0.8882 \pm 0.02$  HTA vs  $0.8896 \pm 0.03$  receptor/actina UA control) y P2Y1 ( $0.8724 \pm 0.06$  HTA vs  $0.9512 \pm 0.01$  receptor/actina UA control) a nivel de proteína no se modificó en la médula de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control (Figura 4B). La expresión del receptor P2X1 a nivel de RNAm disminuyó en la corteza de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control ( $0.8208 \pm 0.008$  HTA vs  $0.9247 \pm 0.01$  receptor/actina UA control) mientras que no se observaron cambios en la expresión del receptor P2Y1 entre ambos grupos experimentales ( $0.7935 \pm 0.02$  HTA vs  $0.8544 \pm 0.01$  receptor/actina UA control) (Figura 5A). La expresión del receptor P2X1 a nivel de RNAm disminuyó ( $0.8182 \pm 0.02$  HTA vs  $0.9095 \pm 0.02$  receptor/actina UA control) y la expresión del receptor P2Y1 no se modificó

( $0.7838 \pm 0.02$  HTA vs  $0.8614 \pm 0.02$  receptor/actina UA control) en la médula de los animales con hipertensión en comparación con el grupo control (Figura 5B).

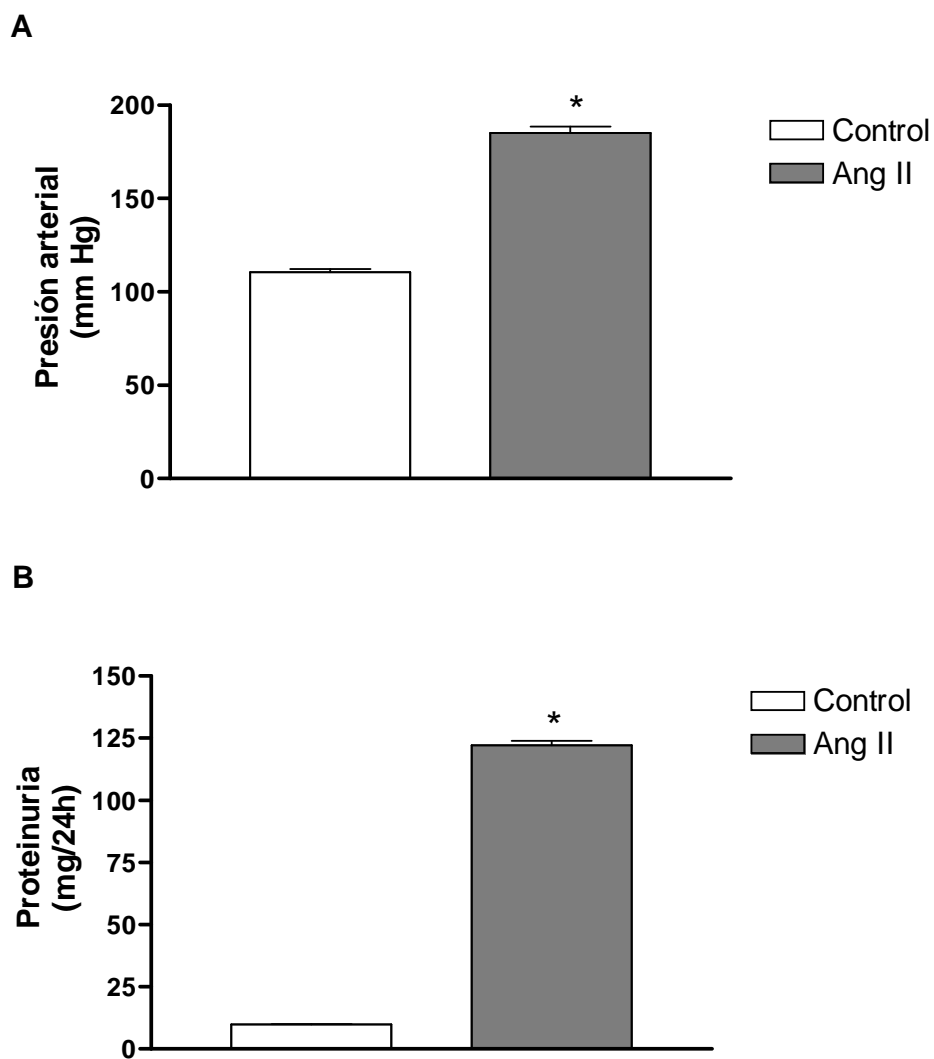


Figura 3. A) Presión arterial y B) proteinuria el día 14 de la infusión de ANGII (435ng/kg/min) y animales control. (\* $p < 0.05$  vs Control)

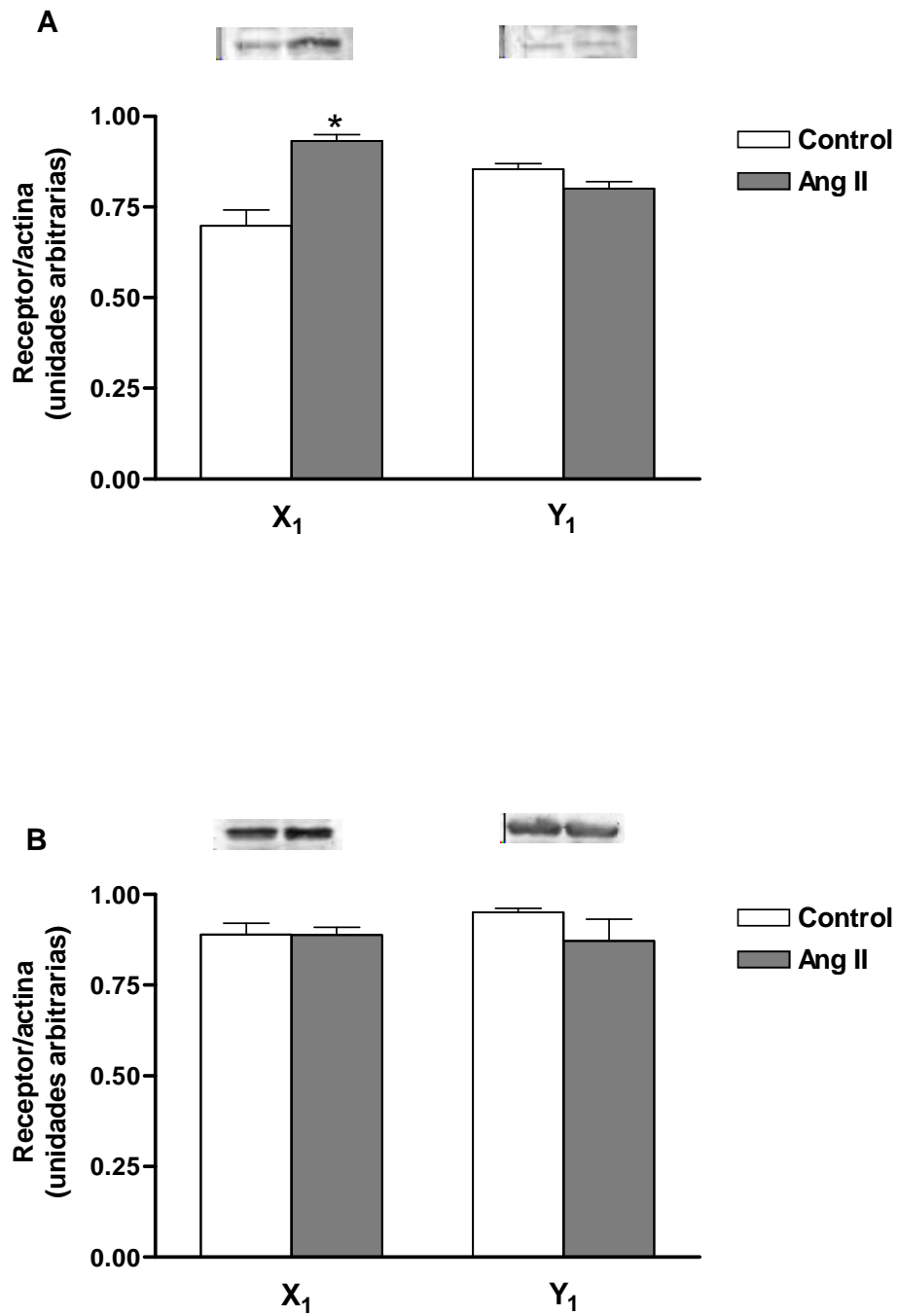


Figura 4. Expresión de las proteínas P2X1 y P2Y1 en la corteza (A) y medula (B) renal de ratas con hipertensión inducida por Ang II (435ng/Kg/min) el día 14 de la infusión y animales control. (\* =  $p < 0.05$  vs Control).



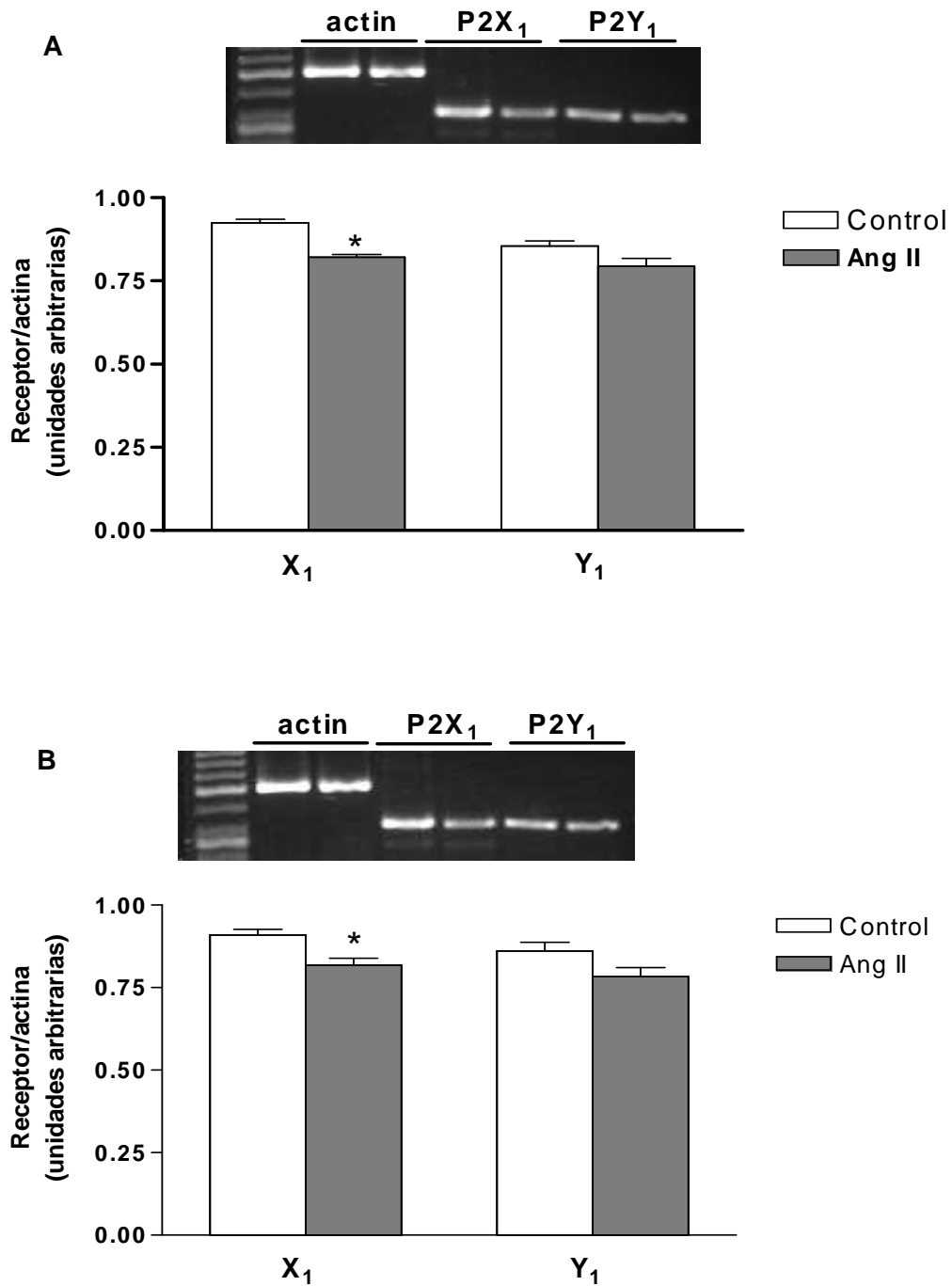


Figura 5. Expresión de RNA mensajero de los receptores P2X<sub>1</sub> y P2Y<sub>1</sub> en la corteza (A) y médula (B) renal de ratas con hipertensión inducida por Ang II (435ng/Kg/min) el día 14 de la infusión y animales control. (\* =  $p < 0.05$  vs Control).

## **IX. DISCUSIÓN.**

Recientemente se ha reportado que el endotelio, el músculo liso vascular y los nervios perivasculares liberan ATP y este participa en la modulación del tono vascular (41, 42, 43, 44). La degradación extracelular del ATP se lleva a cabo mediante tres nucleotidasas que se localizan en la cara externa de la membrana celular: 1) Las ecto-nucleósido trifosfato-difosfohidrolasas (E-NTPDasas) que eliminan un fosfato del ATP para formar ADP, 2) Las ecto-nucleótido pirofosfatasas/fosfodiesterasas (E-NPPasas) que hidrolizan el ATP para formar AMP y pirofosfato, y 3) Las ecto-5`-nucleotidasas (5`ND) enzimas responsables de la degradación final del ATP, que eliminan un grupo fosfato del AMP para formar adenosina (45, 77).

Los receptores purinérgicos han sido clasificados en dos tipos: P1 y P2. Los receptores P1 tienen mayor afinidad por AMP y adenosina, en tanto que los receptores P2 tienen mayor afinidad por el ATP y el ADP (124, 125).

Recientemente Franco y cols. (75) estudiaron la participación de la adenosina y de los receptores P1 en la hipertensión dependiente de angiotensina II. En este modelo de hipertensión reportaron que la 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina, un inhibidor del receptor A1 a adenosina (ADO) revierte la vasoconstricción renal, además no observaron cambios en la expresión de este receptor, pero si un aumentó en la expresión del receptor A3 y una disminución de los receptores A2a, estos resultados sugieren que la adenosina contribuye con la vasoconstricción renal en la hipertensión dependiente de angiotensina II a través de la activación del receptor A1 y A3, ya que al disminuir la expresión del receptor A2a (vasodilatador) predomina el efecto A1 vasoconstrictor; es decir se observó

un desequilibrio entre la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora a adenosina en la hipertensión dependiente de angiotensina II. En este mismo modelo de hipertensión, se observó un aumento en la concentración de adenosina intrarrenal que disminuyó al inhibir la 5' nucleotidasa con  $\alpha$ - $\beta$ -mADP. Esto sugiere que la inhibición de la 5'ND en la hipertensión aumenta la concentración de ATP y este activa a los receptores P2. Al respecto Navar y cols. (63) reportaron que en la hipertensión dependiente de angiotensina II se aumenta la concentración intersticial de ATP y el tratamiento con clopidogrel (antagonista del receptor P2Y<sub>12</sub>) y PPADS (antagonista no selectivo P2) previenen la expresión de la  $\alpha$ -actina en las células mesangiales, la lesión de la arteriola aferente, la proliferación de las células tubulares así como la infiltración de macrófagos sin cambios en la presión arterial sistémica; estos resultados sugieren que la activación de los receptores purinérgicos P2 contribuyen en la transformación de las células mesangiales, la inflamación renal y la hipertrofia vascular en la hipertensión dependiente de angiotensina II (63). De acuerdo a los resultados mencionados previamente, es posible que tanto la adenosina como el ATP participen en las alteraciones de la función renal y el daño renal que se observan en la hipertensión dependiente de angiotensina II; por lo que en el presente trabajo se planteó el siguiente objetivo, evaluar la expresión de los receptores P2X<sub>1</sub> y P2Y<sub>1</sub> a nivel de proteína y RNAm en el riñón de animales con hipertensión dependiente de Angiotensina II, como un estudio inicial que origine una línea de investigación que nos permitirá proponer un nuevo mecanismo celular para prevenir y/o disminuir la lesión renal en la hipertensión.

En el presente estudio, la expresión del receptor P2X1, disminuye a nivel de RNAm y aumenta a nivel de proteína en la corteza renal de ratas con hipertensión dependiente de angiotensina II. Estos resultados sugieren una regulación a la alta del receptor P2X1, así como que la regulación de la expresión de este receptor es a nivel post-transcripcional y/o post-traduccional. En condiciones fisiológicas se ha reportado que la infusión arterial intrarrenal de ATP produce vasoconstricción renal por activación del receptor P2X1 y aumenta por la inhibición de la sintasa del óxido nítrico; al respecto Zhao y col, 2005 (78) han reportado que en la red vascular renal la expresión del receptor P2X1 a nivel de proteína no se modifica en la hipertensión dependiente de Ang II, pero disminuye la vasoconstricción en respuesta al ATP exógeno, estos autores han propuesto que sus resultados se deben a que disminuye la entrada de  $Ca^{++}$  en las células del músculo liso. Al respecto nuestros resultados sugieren lo contrario, que el aumento en la expresión del receptor P2X1 pueden aumentar las concentraciones de calcio intracelular y contribuir a la vasoconstricción renal observada en la hipertensión dependiente de angiotensina II (78).

En experimentos preliminares realizados por Franco y cols. (ASN 2008A), se demostró que la inhibición de los receptores P2 con PPADS, un inhibidor no selectivo de los receptores P2 produce vasodilatación renal y la función del riñón retorna a valores cercanos a lo normal, sin cambios en la presión arterial; hasta el momento esto demuestra que los receptores P2 contribuyen con la vasoconstricción renal en la hipertensión dependiente de angiotensina II; sin embargo es necesario realizar experimentos con el uso de antagonistas selectivos

de los receptores, para definir la función y participación de estos en las alteraciones de la función renal en hipertensión.

En el presente estudio, cuando se determinó la expresión del receptor P2Y1 a nivel de RNAm y proteína en la corteza renal de ratas con hipertensión dependiente de angiotensina II, no se modificó su expresión, no existen evidencias hasta el momento de la participación de estos receptores en las alteraciones renales en este modelo. Por otra parte Navar y cols. (63) sugieren que los receptores P2Y12 son activados principalmente por el ADP pero también pueden ser activados por el ATP. Al respecto solo se ha demostrado la expresión del receptor P2Y12 a nivel de RNAm, por lo que en ésta línea de investigación se continuará con el estudio de la expresión del receptor P2Y12 a nivel de proteína y RNAm para valorar su papel en daño renal secundario a hipertensión.

Cuando se determinó la expresión de los receptores P2X1 y P2Y1 en la médula renal, no se observaron cambios en la expresión a nivel de proteína, pero disminuyó el RNAm de los receptores P2X1. Es decir, la regulación del receptor P2X1 en la médula también parece ser a nivel post-transcripcional y/o post-traducciona, sin embargo como no se modificó la proteína, podemos sugerir que la degradación del receptor puede estar disminuida o bien que la vida media del mismo es más prolongada.

## **X. CONCLUSIONES.**

Estos resultados sugieren que la angiotensina II induce regulación a la alta de los receptores P2X1, los cuales pueden contribuir a la vasoconstricción y lesión renal que se observan en la hipertensión inducida por Ang II. Esta observación sugiere que la administración temporal de angiotensina modifica los receptores purinérgicos P2.

## **XI. REFERENCIAS.**

- 1.- Cherry, DK, Burt, CW, Woodwell, DA. Advance data from vital and health statistics. Hyattsville, MD. National Center for Health Statistics, 2003; No 337.
- 2.- Hajjar, I, Kotchen, TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. JAMA 2003; 290:199
- 3.- Fields, LE, Burt, VL, Cutler, JA, et al. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. Hypertension 2004; 44:398.
- 4.- Velázquez MO, Rosas PM, Lara EA, Pastelín HG. Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. Arch Cardiol Mex. 2002; 72: 71.
- 5.- Velázquez MO, Rosas PM, Lara EA, Pastelín HG. Re-encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): Consolidación Mexicana de los Factores de Riesgo Cardiovascular. Cohorte Nacional de Seguimiento. Arch Cardiol Mex 2005; 75: 96.
- 6.- Staessen, JA, Wang, J, Bianchi, G, Birkenhager, WH. Essential hypertension. Lancet 2003; 361:1629.
- 7.- Sonne-Holm, S, Sorensen, TI, Jensen, G, Schnohr, P. Independent effects of weight change and attained body weight on prevalence of arterial hypertension in obese and non-obese men. BMJ 1989; 299:767.
- 8.- Khot, UN, Khot, MB, Bajzer, CT, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. JAMA 2003; 290:898.
- 9.- Pastor-Barriuso, R, Banegas, JR, Damian, J, Appel, LJ. Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and pulse pressure: An evaluation of their joint effect on mortality. Ann Intern Med 2003; 139:731.

- 10.- Wilson, PW. Established risk factors and coronary artery disease: The Framingham Study. *Am J Hypertens* 1994; 7:7S.
- 11.- Franklin, SS, Larson, MG, Khan, SA, et al. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 103:1245.
- 12.- Psaty, BM, Furberg, CD, Kuller, LH, et al. Association between blood pressure level and the risk of myocardial infarction, stroke, and total mortality. The Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med* 2001; 161:1183.
- 13.- Levy, D, Larson, MG, Vasan, RS, et al. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; 275:1557.
- 14.- Lorell, BH, Carabello, BA. Left ventricular hypertrophy. Pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000; 102:470.
- 15.- Vakili, BA, Okin, PM, Devereux, RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 2001; 141:334.
- 16.- Staessen, JA, Fagard, R, Thijs, L, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997; 350:757.
- 17.- Thrift, AG, McNeil, JJ, Forbes, A, et al. Risk factors for cerebral hemorrhage in the era of well controlled hypertension. Melbourne Risk Factor Study (MERFS) Group. *Stroke* 1996; 27:2020.
- 18.- Coresh, J, Wei, L, McQuillan, G, et al. Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med*



2001; 161:1207.

19.- Hsu, CY, McCulloch, CE, Darbinian, J, et al. Elevated blood pressure and risk of end-stage renal disease in subjects without baseline kidney disease. Arch Intern Med 2005; 165:923.

20.- Halperin, RO, Sesso, HD, Ma, J, et al. Dyslipidemia and the risk of incident hypertension in men. Hypertension 2006; 47:45.

21.- Johnson RJ, Gordon KL, Suga S, Duijvestijn AM, Griffin K, Bidani A.: Renal injury and salt sensitive hypertension after exposure to catecholamines. Hypertension 1999; 34:151.

22.- Johnson RJ, Schreiner GF: Hypothesis: The role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. Kidney Int. 1997; 52:1169.

23.- de Wardener HE. The primary role of the kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension. Part 1. Clin Sci 1990;79:193.

24.- de Wardener HE. The primary role of the kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension. Part II. Clin Sci 1990;79:289.

25.- Rettig R, et al. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. Am J Physiol 1990;258:F606.

26.- Guidi E, et al. Hypertension in man with kidney transplant: role of familial versus other factors. Nephron 1985;41:14.

27.- Bianchi G, et al. Changes in renin, water balance and sodium balance during development of high blood pressure in genetically hypertensive rat. Circ Res 1975;36(1):153.

28.- Graf C, et al. Sodium retention and hypertension after kidney transplantation in

rats. Hypertension 1993;21:724

29.- Hollenberg NK, Williams GH, Adams DF. Essential hypertension: abnormal renal vascular and endocrine responses to a mild psychological stimulus. Hypertension 1981;3:11.

30.- Weinberger MH, et al. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. Hypertension 1986;9:127.

31.- Fujija T, et al. Factors influencing blood pressure in salt sensitive patients with hypertension. Am J Med 1980;69:334.

32.- Franco M, Perez-Mendez O, Gonzalez L, Pacheco U. Sanchez.Lozada LG, Santamaría J, Tapia E, Monreal R, Martínez F. Renal Interstitial adenosine is increased in angiotensin II induced hypertensive rats. Am J. Physiol. 2008; 294:F84.

33.- Navar LG, Inscho EW, Majid SA, et al: Paracrine regulation of the renal microcirculation. Physiol Rev 1996; 76:425.

34.- He J, Marsh DJ: Effect of captopril on fluctuations of blood pressure and renal blood flow in rats. Am J Physiol 1993; 264:F37.

35.- Arendshorst WJ, Brannstrom K, Ruan X: Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. J Am Soc Nephrol 1999; 10(suppl 11):S149.

36.- Schnermann J, Briggs JP: Effect of angiotensin and other pressor agents on tubuloglomerular feedback responses. Kidney Int Suppl 1990; 30:S77.

37.- Wang H, Garvin JL, Carretero O. Angiotensin II enhances tubuloglomerular feedback via luminal AT1 receptors on the macula densa. Kidney International 2001; 60: 1851.

- 38.- Kobori Hiroyuki, Nangaku Masaomi, Navar Gabriel, Nishiyama Akira. *Pharmacol Rev.* 2007 September ; 59;3: 251.
- 39.- Nishiyama Akira, Majid Dewan S. A, Taher Khandaker A, Miyatake Akira, Navar L. Gabriel. Relation Between Renal Interstitial ATP Concentrations and Autoregulation-Mediated Changes in Renal Vascular Resistance. *Circ. Res.* 2000;86;656.
- 40.- Vials AJ, Burnstock G. ATP release from the isolated perfused guinea pig heart in response to increase flow. *Vasc Res.* 1996;33:1.
- 41.- Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev.* 1990;70:761.
- 42.- Cox BF, Smits GJ. Regional hemodynamic effects of purinergic P2 receptor subtype agonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277: 1492.
- 43.- Pearson JD, Gordon JL. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature.* 1979;281:384.
- 44.- Evans RJ, Darkach V, Suprenant A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature.* 1992;357:503.
- 45.- Komlosi P., Fintha A., Bell P.D. Renal cell-to-cell communication via extracellular ATP. *Physiology* 2005; 20:86.
- 46.- Schwiebert Erik M. ATP release mechanisms, ATP receptors and purinergic signaling along the nephron. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2001; 28: 340.
- 47.- Gordon JL. Extracellular ATP. Effects, sources, and fates. *Biochem. J.* 1986; 233: 309.

- 48.- Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM. Bioluminescent detection of ATP release mechanisms in epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: C1391.
- 49.- Drury A.N., Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 1929;68: 213.
- 50.- Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, 1997; 36: 1127.
- 51.- Burnstock G., Purinergic signaling. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: S172.
- 52.- Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 413.
- 53.- Volker Vallon. P2 receptors in the regulation of renal transport mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F10.
- 54.- Inscho EW, Carmines PK, and Navar LG. Juxtamedullary afferent arteriolar responses to P1 and P2 purinergic stimulation. *Hypertension* 1991; 17: 1033.
- 55.- Inscho EW, Cook AK, Imig JD, Vial C, and Evans RJ. Physiological role for P2X1 receptors in renal microvascular autoregulatory behavior. *J Clin Invest* 2003; 112: 1895.
- 56.- Inscho EW, Cook AK, Mui V, and Miller J. Direct assessment of renal microvascular responses to P2-purinoceptor agonists. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1998; 274: F718.
- 57.- Inscho EW, Cook AK, and Navar LG. Pressure mediated vasoconstriction of juxtamedullary afferent arterioles involves P2-purinoceptor activation. *Am J Physiol*

Renal Fluid Electrolyte Physiol 1996; 271: F1077.

58.- Komlosi P, Peti-Peterdi J, Fuson AL, Fintha A, Rosivall L, and Bell PD. Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake. Am J Physiol Renal Physiol 2004, 286: F1054.

59.- Majid DS, Inscho EW, and Navar LG. P2 purinoceptor saturation by adenosine triphosphate impairs renal autoregulation in dogs. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 492.

60.- Mitchell KD and Navar LG. Modulation of tubuloglomerular feedback responsiveness by extracellular ATP. Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol 1993; 264: F458.

61.-Nishiyama A, Majid DS, Walker M III, Miyatake A, and Navar LG. Renal interstitial ATP responses to changes in arterial pressure during alterations in tubuloglomerular feedback activity. Hypertension 2001; 37: 753.

62.- Schwiebert EM and Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. Biochim Biophys Acta 2003; 1615: 7.

63.- Graciano ML, Nishiyama A, Jackson K, Seth DM, Ortíz R, Prieto-Carrasquero MC, Kobori K, Navar LG. Purinergic receptors contribute to early mesangial cell transformation and renal vessel hypertrophy during angiotensin II-induced hypertension. Am. J. Physiol. 2008; 294: F161.

64.- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000; 362: 299.

65.- Inscho EW. P2 receptors in the regulation of renal microvascular function Am. J. Physiol 2001; 280: F927.

66.- Wang DJ, Huang NN, Heppel LA. Extracellular ATP and ADP stimulate

proliferation of porcine aortic smooth muscle cells. *J. Cell Physiol* 1992; 153: 221.

67.- Yegutky G, Bodin P, and Bursntock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5' nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 129:921.

68.- Nishiyama A, Navar LG. ATP mediates tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiol* 2002; 283:R273.

69.- Erlinge D, YooH, Reis DJ, Wahlestedt C. mitigenic effects of ATP on vascular smooth muscle cells vs other growth factors and sympathetic cotransmitters. *Am. J. Physiol* 1993, 265: H1089.

70.- Huwiler A. Pfeilschifter J. Stimulation by extracellular ATP and UTP of the mitogen-activated protein kinase cascade proliferation of rat mesangial cells. *British J. Pharmacol* 1994; 113:1455.

71.- Turner CM, Vonend O, Chan C, Burnstock G, and Unwin RJ. The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs* 2003; 175: 105.

72.- Chan CM, Unwin RJ, Bardini M, Oglesby IB, Ford APDW, Townsend-Nicholson A, Burnstock. Localization of P2X purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys. *Am. J. Physiol* 1998; 274:F799.

73.- Franco M, Martinez F, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Santamaría J, Montoya A, Nepomuceno T, Bautista R, Tapia E, Herrera.Acosta J. Angiotensin II, Interstitial inflammation, and the pathogenesis of salt sensitive hypertension. *Am. J. Physiol.* 2006; 291(6): F1281.

74.- Kost CK, Jackson EK. Effect of angiotensin II on plasma adenosine concentrations in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991; 17(5):838.

75.- Franco M., Bautista R., Pérez-Méndez O., González L., Pacheco U, Sánchez-Lozada L.G., Santamaría J., Tapia E., Monreal R., Martínez F. Renal interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F84.

76.- Franco M., Tapia E, Santamaría J, Zafra I, García-Torrez R., Gordon KL, Pons H, Rodríguez Iturbe B., Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt sensitive hypertension after angiotensin II exposure . *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001; 12: 2263.

77.- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 299.

78.- Zhao X., Cook A.C., Field M, Edwards B., Zhang S, Zhang Z, Pollock J.S., Imig J.D., Inscho E. Impaired  $Ca^{++}$  Signaling Attenuates P2X Receptor-Mediated Vasoconstriction of Afferent Arterioles in Angiotensin II Hypertension. *Hypertension* 2005; 46; 562.