



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Determinación del efecto del [4-tert-butil-2,6-bis
(tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] en la expresión de la
Enzima Convertidora de Angiotensina y Enzima
Convertidora de Angiotensina 2 en SHR.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

DIEGO LEZAMA MARTÍNEZ

**ASESORAS: DRA. LUISA MARTÍNEZ AGUILAR
DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación del efecto del [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-limetil) fenol] en la expresión de la enzima convertidora de Angiotensina y enzima convertidora de Angiotensina II en Ratas SHR

Que presenta el pasante: Diego Lezama Martínez

Con número de cuenta: 307517368 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	MFC. Cecilia Hernández Barba	
1er. SUPLENTE	M. en C. Jazmín Flores Monroy	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

Agradecimientos

A mis padres, por su apoyo a lo largo de mis estudios, por otorgarme un ambiente adecuado para mi desarrollo y por la oportunidad de tomar mis propias decisiones.

A la Dra. Claudia González Espinosa porque sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de este proyecto además de que sus observaciones me fueron de gran utilidad para el diseño de esta tesis.

Al M. en C. Alfredo Ibarra Sánchez por su paciencia, tiempo y esfuerzo al enseñarme las técnicas y procedimientos a realizar dentro del laboratorio, además de otorgarme sus opiniones sobre distintas cuestiones que me surgían.

A la Dra. Luisa Martínez Aguilar por darme la oportunidad y confianza para trabajar en su laboratorio, por todas las enseñanzas, pláticas y proyectos, lo que me permitió aprender cosas nuevas siempre, además de impulsarme a ser una mejor persona cada día.

A la M. en C. Jazmín Flores Monroy por la orientación sobre artículos, formatos y reactivos, además de las múltiples pláticas que me ofrecían nuevos puntos de vista y a la vez me divertían.

A mis profesores y honorable jurado por todas sus enseñanzas, por su paciencia durante toda la carrera y principalmente por su dedicación que me llevó a esforzarme.

A la FESC-UNAM por brindarme un sitio de estudio y una carrera que disfrute mucho y que me ayudo a comprender demasiadas cosas.

A Jorge, Marbella, Karla, Fabiola, Itzel, Zyanya y Ely, por todo el tiempo que pasamos trabajando arduamente y por los distintos sitios que me mostraron para comer, además de que cambiaron mi perspectiva sobre el bromuro de etidio y los Western blots.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto IN2212213-3 y a al Programa de Apoyo para Cátedras de Investigación, Vinculación y Educación (PACIVE) Cátedra CONS-26-FESC-UNAM.

A Gaby y Jhovan, por formar parte de un equipo con el que trabaje durante toda la carrera y con el que me divertí mucho, ambos siempre me parecieron muy sinceros y sus puntos de vista muy interesantes, además de que sus pláticas nunca fueron aburridas.

A Vero, por compartir nuestros gustos por el anime, Raúl, por todas las conversaciones que siempre me hacen reír, Karina, por haber trabajado juntos durante todo este tiempo y enfrentar los nervios de estar frente a un grupo, Sandra, por enseñarme muchas cosas sobre tu trabajo y la cultura coreana, Andrea, con tus múltiples objetivos que espero pronto alcances, Liz, por las conversaciones y caminatas tan entretenidas.

Y a todos los que me faltan porque de una u otra forma me ayudaron y permitieron que alcanzara este objetivo.

Muchas Gracias.

ÍNDICE GENERAL	PÁGINA
Abreviaturas	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Índice de Gráficas	V
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Sistema Cardiovascular.....	3
2.1.1 Estructura.....	4
2.1.1.1 Corazón.....	4
2.1.1.1.1 Ventrículo izquierdo.....	6
2.1.1.2 Vasos sanguíneos.....	6
2.1.1.2.1 Aorta.....	8
2.1.2 Fisiología del aparato circulatorio.....	10
2.1.1 Regulación cardíaca.....	10
2.1.2 Regulación de la presión arterial.....	11
2.2 Sistema Renina Angiotensina.....	12
2.2.1 SRAA y la presión arterial.....	12
2.2.2 Angiotensinógeno.....	13
2.2.3 Renina.....	13
2.2.4 Angiotensina II.....	14
2.2.5 Receptor AT1.....	16
2.2.6 Receptor AT2.....	17
2.2.7 Bradicinina.....	18
2.2.8 Enzima Convertidora de Angiotensina.....	19
2.2.9 Enzima Convertidora de Angiotensina 2.....	21
2.3 Hipertensión Arterial.....	24
2.3.1 Clasificación.....	24

2.3.2 Etiología.....	26
2.3.3 Epidemiología.....	31
2.3.4 Síntomas y diagnóstico.....	34
2.3.5 Tratamiento no farmacológico.....	35
2.3.6 Tratamiento farmacológico.....	35
2.4 Desarrollo de nuevos fármacos.....	43
2.4.1 Familia de compuestos LQM300.....	44
2.4.1.1 [4-tert-butil-2, 6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol]..	46
3.0 HIPÓTESIS.....	47
4.0 OBJETIVOS.....	47
4.1 Objetivo general.....	47
4.2 Objetivos específicos.....	47
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
5.1 Material.....	48
5.2 Preparación de soluciones.....	49
5.3 Metodología para estandarización de la técnica RT-PCR para GAPDH, ECA y ECA2 en SHR.....	50
5.3.1 Selección de Primers.....	50
5.3.2 Obtención de tejido.....	52
5.3.3 Extracción de ARN.....	52
5.3.4 RT.....	53
5.3.5 PCR.....	54
5.3.6 Electroforesis en gel de agarosa al 2%.....	56
5.4 Metodología para la experimentación.....	57
5.4.1 Análisis estadístico.....	57
5.5 Diseño experimental.....	58
6.0 RESULTADOS.....	59
6.1 Resultados de la estandarización de la técnica.....	59
6.2 Resultados experimentales.....	62

7.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS	67
8.0 CONCLUSIONES	72
9.0 REFERENCIAS	73
Anexo	85

Abreviaturas

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AMV	Virus de mieloblastosis aviar
ARAI	Antagonistas del receptor de Angiotensina II
AT₁	Receptor tipo 1 de la Angiotensina II
AT₂	Receptor tipo 2 de la Angiotensina II
BK	Bradicinina
Ca²⁺	Ion Calcio
CK2	Cinasa de la Caseína II
CO₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Dinucleótidos Trifosfatados
DEPC	Dietil Pirocarbonato
ECA	Enzima convertidora de la Angiotensina
ECA2	Enzima convertidora de la Angiotensina II
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales 1/2
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
GAPDH	Gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa
GPI	Glucosil Fosfatidil Inositol
HTA	Hipertensión Arterial
HGF	Factor de crecimiento hepático
IECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina

IM	Infarto al miocardio	
JNK	Cinasas c-Jun N-Terminal	
LQM-319	[4-tert-butil-2, 6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol]	I
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster	
MAPKs	Proteín-Cinasas activadas por mitógenos	
MKK7	Proteín-Cinasas activadas por mitógenos 7 de especificidad dual	
MYH9	Cadena pesada de la Miosina no muscular tipo IIA	
MgSO₄	Sulfato de Magnesio	
NF- κB	Factor Nuclear κB	
NO	Óxido Nítrico	
PA	Presión arterial	
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa	
PKC	Proteína Cinasa C	
PKG	Proteína Cinasa G	
ARN	Ácido Ribonucleico	
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero	
RPR	Receptor para Prorenina	
RT	Retrotranscriptasa	
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa con transcripción inversa	
SHR	Rata espontáneamente hipertensa	
SMC	Células de músculo liso	
SRA	Sistema Renina Angiotensina	
SRE	Elemento de respuesta al suero	
<i>Tfl</i>	<i>Thermus flavus</i>	
UV	Ultravioleta	

Índice de Figuras	Página
Figura 1.- Sistema Cardiovascular.....	3
Figura 2.- Anatomía del Corazón.....	5
Figura 3.- Estructura de los vasos sanguíneos.....	8
Figura 4.- Aorta.....	9
Figura 5.- Isoforma 1 tipo somática.....	20
Figura 6.- Isoforma 1 tipo plasmática.....	20
Figura 7.- Isoforma 2 tipo testicular.....	21
Figura 8.- Esquema General de Sistema Renina Angiotensina.....	23
Figura 9.- HTA en la población mundial.....	31
Figura 10.- Prevalencia de la Hipertensión en adultos, por región y por ingresos....	32
Figura 11.- HTA en México, distribución de acuerdo al diagnóstico, tratamiento y sus resultados.....	33
Figura 12.- Prevalencia de HTA por sexo y años de la encuesta.....	33
Figura 13.- Tipos de diuréticos, mecanismo de acción y sitio donde actúan.....	37
Figura 14.- Representación del mecanismo de acción del Captopril y el Enalapril sobre la ECA.....	41
Figura 15.- Fases del desarrollo de un nuevo fármaco.....	44
Figura 16.- Estructura química de la Changrolina.....	45
Figura 17.- Diagrama General de la Síntesis de Compuestos Tiomorfolínicos.....	46
Figura 18.- Estructura química del compuesto LQM319.....	46
Figura 19.- Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de GAPDH.....	50
Figura 20.- Especificaciones de primers para GAPDH.....	51
Figura 21.- Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA.....	51
Figura 22.- Especificaciones de primers para ECA.....	51
Figura 23.- Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA2.....	52
Figura 24.- Especificaciones de primers para ECA2.....	53
Figura 25.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Gradiente de GAPDH de 20-40 ciclos, el tamaño del producto es de 207bp. B. Gradiente de ECA de 30-45 ciclos, el producto es de 442bp.....	61
Figura 26.- A. Alineamiento de primers de ECA. B. Gradiente de ECA2 va de 35-55 Ciclos, con un producto de 281bp.....	61
Figura 27.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Expresión de GAPDH en Ventrículo, grupo tratado con Captopril. B. Expresión de GAPDH en Ventrículo, grupo tratado con LQM-319.....	65
Figura 28.- A. Expresión de GAPDH en Aorta, grupo tratado con Captopril. B. Expresión de GAPDH en Aorta, grupo tratado con LQM-319.....	65
Figura 29.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Expresión de ECA en Ventrículo, grupo tratado con Captopril y LQM-319. B. Expresión de ECA en Aorta, grupo tratado con Captopril y LQM-319.....	66

Figura 30.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Expresión de ECA2 en Ventrículo, grupo tratado con Captopril. B. Expresión de ECA2 en Ventrículo, grupo tratado con LQM-319. C. Expresión de ECA2 en Aorta, grupo tratado con Captopril. D Expresión de ECA2 en Aorta, grupo tratado con LQM-319. 66

Figura 31.- Esquema que representa el posible mecanismo por el cual el Captopril y el compuesto LQM319 provocan sus efectos sobre la alteración de la expresión del *ARNm* de ECA y ECA2..... 71

Índice de Tablas

Tabla 1.- Promedio de la Presión arterial en personas sanas de acuerdo al sexo en México.....	11
Tabla 2.- Clasificación de la Hipertensión Arterial para su diagnóstico.....	26
Tabla 3.- Secuencia y tamaño de producto de los primers de GAPDH, ECA y ECA2.	50
Tabla 4.- Reactivos y cantidades a utilizar en la RT-PCR.....	54
Tabla 5.- Condiciones a utilizar en el termociclador para la retrotranscripción.....	54
Tabla 6.- Condiciones de PCR para los gradientes de expresión.....	55
Tabla 7.- Número de ciclos para cada una de las PCR de cada gen.....	55
Tabla 8.- Temperatura de cada pozo de PCR para alineamiento de primers de ECA.	55
Tabla 9.- Número de ciclos fijado para la PCR de cada gen.....	57
Tabla 10.- Gradiente de expresión de GAPDH de acuerdo al número de ciclos.....	85
Tabla 11.- Gradiente de expresión de ECA1 de acuerdo al número de ciclos.....	85
Tabla 12.- Alineamiento de Primers de ECA1 a distintas temperaturas.....	85
Tabla 13.- Gradiente de expresión de ECA2 de acuerdo al número de ciclos.....	84
Tabla 14.- Promedio de la expresión de GAPDH en OD (Unidades Relativas) en Ventrículo para los lotes control y tratamiento.....	84
Tabla 15.- ANOVA para los grupos de expresión de GAPDH en Ventrículo.....	86
Tabla 16.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para GAPDH en Ventrículo por comparación de grupos con Wistar.....	86
Tabla 17.- Promedio de la expresión de ECA1/GAPDH (Unidades relativas) en Ventrículo para los lotes control y tratamiento.....	86
Tabla 18.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA1 en Ventrículo.....	86
Tabla 19.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA1 en Ventrículo por comparación de grupos con Wistar.....	86
Tabla 20.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA1 en Ventrículo por comparación de grupos con SHR.....	86
Tabla 21.- Promedio de la expresión de ECA2/GAPDH (Unidades relativas) en Ventrículo para los lotes control y tratamiento.....	87
Tabla 22.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA2 en Ventrículo.....	87
Tabla 23.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA2 en Ventrículo por comparación de grupos con Wistar.....	87

Tabla 24.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA2 en Ventrículo por comparación de grupos con SHR.....	87
Tabla 25.- Promedio de la expresión de GAPDH en OD (Unidades relativas) en Aorta para los lotes control y tratamiento.....	87
Tabla 26.- ANOVA para los grupos de expresión de GAPDH en Aorta.....	87
Tabla 27.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para GAPDH en Aorta por comparación de grupos con Wistar.....	88
Tabla 28.- Promedio de la expresión de ECA1/GAPDH (Unidades relativas) en Aorta para los lotes control y tratamiento.....	88
Tabla 29.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA1 en Aorta.....	88
Tabla 30.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA1 en Aorta por comparación de grupos con Wistar.....	88
Tabla 31.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA1 en Aorta por comparación de grupos con SHR.....	88
Tabla 32.- Promedio de la expresión de ECA2/GAPDH (Unidades relativas) en Aorta para los lotes control y tratamiento.....	88
Tabla 33.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA2 en Aorta.....	89
Tabla 34.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA2 en Aorta por comparación de grupos con Wistar.....	89
Tabla 35.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA2 en Aorta por comparación de grupos con SHR.....	89

Índice de Gráficas

Gráfica 1.- Gradiente de expresión del gen Housekeeping GAPDH de acuerdo al número de ciclos.....	59
Gráfica 2.- Gradiente de expresión del gen ECA de acuerdo al número de ciclos.....	59
Gráfica 3.- Gradiente de temperatura para el alineamiento de los primers de ECA.....	60
Gráfica 4.- Gradiente de expresión del gen ECA2 de acuerdo al número de ciclos.....	60
Gráfica 5.- Expresión de GAPDH en Ventrículo de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319.....	62
Gráfica 6.- Expresión de ECA en Ventrículo de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM319.....	62
Gráfica 7.- Expresión de ECA2 en Ventrículo de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM319.....	63
Gráfica 8.- Expresión de GAPDH en Aorta de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM319.....	63
Gráfica 9.- Expresión de ECA en Aorta de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM319.....	64
Gráfica 8.- Expresión de ECA2 en Aorta de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319.....	64

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial ha sido un problema de salud nacional que se ha visto agravado en los últimos años y ha llegado a ser considerada como una de las principales causas de muerte en nuestro país [1]. Debido a que esta patología se encuentra estrechamente relacionada con el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA), surge la importancia de su estudio y el de sus componentes de forma individual, con la finalidad de determinar biomarcadores que permitan su diagnóstico y evolución, para encontrar nuevos tratamientos o aumentar la eficacia de los ya existentes [2].

Debido a esta necesidad se genera el compuesto [4-*tert*-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319), el cual pertenece a los compuestos tiomorfolínicos, sintetizados en la FESC, que forma parte de la familia de los compuestos LQM300 y posee propiedades antihipertensivas [3]. Este compuesto ha presentado un efecto antihipertensivo significativo en modelo *in vitro* utilizando tejidos de ratas espontáneamente hipertensas, comparable al de captopril, por lo que se le atribuyen efectos antihipertensivos [4]. Para determinar que este compuesto es un antihipertensivo se requiere de diferentes estudios que permitan su incorporación como medicamento.

Con base en lo anterior se busca evaluar la actividad del compuesto LQM319 a nivel molecular comenzando con el *ARNm*, ya que se sabe que el nuevo compuesto posee un mecanismo de acción similar al del captopril. Este mecanismo ha sido determinado mediante estudios *in silico* con el software Sybyl Docking, el cual realiza una simulación de interacción fármaco-enzima, indicando que el compuesto LQM319 tiene mayor afinidad por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) que el captopril, que mediante su unión a la ECA disminuye la actividad del SRA [5].

De aquí la importancia de conocer los efectos del LQM319 o captopril sobre las moléculas que participan en la vía de señalización del SRA. Actualmente ha sido reportado que el captopril genera una disminución sobre los niveles de ADN y ARN totales en miocardio [6], cerebro y aorta de rata en ratas inducidas a hipertensión por L-NAME. Además de que los niveles de expresión de *ARNm* de la ECA en ventrículo derecho se encuentran significativamente incrementados en SHR en comparación de las ratas Wistar Kyoto. También se sabe que la administración de Captopril en ratas hipertensas es capaz de prevenir el aumento anormal de los valores de la ECA y mantiene sus niveles de expresión similares a los de ratas Wistar Kyoto [7].

Por estudios previos en aorta de rata espontáneamente hipertensa [4] se ha determinado que el compuesto LQM319 tiene efectos semejantes al captopril, lo que nos permite sugerir que este compuesto modificará de la misma manera la expresión de la ECA y que al igual que mucho otros IECAS no presentará un efecto significativo sobre la expresión de la ECA2 [113].

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Sistema Cardiovascular

El sistema cardiovascular, también conocido como circulatorio, es un sistema que poseen los organismos complejos el cual proporciona una vía de transporte rápida para los nutrientes y una eficaz eliminación de los productos finales del metabolismo hacia sus sitios de excreción.

La circulación sanguínea fue descrita por primera vez en 1628 por William Harvey y constituye el sistema de transporte más importante del cuerpo humano. La principal función de este sistema es el mantener la homeostasis del organismo, es decir, la constancia del medio interno y esto lo hace por medio del transporte de:

- Agua y sales, con lo que se mantiene el equilibrio electrolítico.
- Gases, nutrientes y metabolitos, para continuar el funcionamiento del metabolismo.
- Ácidos y bases, para la regulación del pH.
- Calor a la superficie corporal, para mantener la regulación térmica.
- Agentes de información, como hormonas.
- Sistemas de defensa celulares y humorales [8].

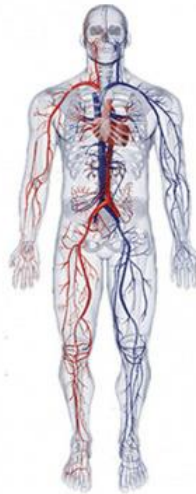


Figura 1.- Sistema Cardiovascular. Se muestra la distribución de vasos sanguíneos y del corazón dentro del cuerpo humano [9].

2.1.1 Estructura

El sistema cardiovascular es un sistema cerrado que comprende al corazón y los vasos sanguíneos. El corazón actúa como una bomba que impulsa la sangre hacia los órganos, tejidos y células del organismo. La sangre suministra oxígeno y nutrientes a cada célula y recoge el dióxido de carbono y las sustancias de desecho producidas por esas células. La sangre es transportada desde el corazón al resto del cuerpo por medio de una red compleja de arterias, arteriolas y capilares y regresa al corazón por las vénulas y venas [10]. Esta parte del sistema recibe el nombre de circulación sistémica. Desde el corazón la sangre es transportada a través del sistema vascular de los pulmones y regresa de nuevo para repetir el ciclo, este proceso se conoce como circulación pulmonar [8].

2.1.1.1 Corazón

El corazón es un órgano hueco en forma de cono formado en su gran mayoría por músculo llamado miocardio, tapizado en su interior por el endocardio y protegido en su exterior por el epicardio y pericardio que lo separa de órganos vecinos. Está situado en el tórax, detrás de la pared condrocostal, en la parte anterior e inferior del mediastino; espacio que se extiende desde el esternón hasta la columna vertebral, entre los pulmones encima del diafragma [11].

Se compone principalmente de músculo cardíaco, el cual está formado por células musculares ramificadas, que poseen 1 o 2 núcleos y que se unen entre sí a través de un tipo de unión propia del músculo cardíaco llamada disco intercalar. A diferencia del músculo esquelético, las fibras musculares cardíacas corresponden a un conjunto de células cardíacas unidas entre sí en disposición lineal.

Las células musculares cardíacas, de unos 15 μm de diámetro y unos 100 μm de largo, tienen el núcleo ubicado al centro del citoplasma. El retículo sarcoplásmico no es muy desarrollado y se distribuye irregularmente entre las miofibrillas. Sin embargo, las mitocondrias que son extremadamente numerosas están distribuidas regularmente dividiendo a las células cardíacas en miofibrillas aparentes. Las células están rodeadas por una lámina externa comparable a la lámina basal de los epitelios [12].

El corazón tiene cuatro cavidades. Las cavidades superiores se denominan «aurícula izquierda» y «aurícula derecha» y las cavidades inferiores se denominan «ventrículo izquierdo» y «ventrículo derecho». Una pared muscular denominada «tabique» separa las aurículas izquierda y derecha y los ventrículos izquierdo y derecho. Las válvulas que controlan el flujo de la sangre por el corazón son cuatro:

- La válvula tricúspide controla el flujo sanguíneo entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho.
- La válvula pulmonar controla el flujo sanguíneo del ventrículo derecho a las arterias pulmonares, las cuales transportan la sangre a los pulmones para oxigenarla.
- La válvula mitral permite que la sangre rica en oxígeno proveniente de los pulmones pase de la aurícula izquierda al ventrículo izquierdo.
- La válvula aórtica permite que la sangre rica en oxígeno pase del ventrículo izquierdo a la aorta, la cual transporta la sangre al resto del organismo [13].

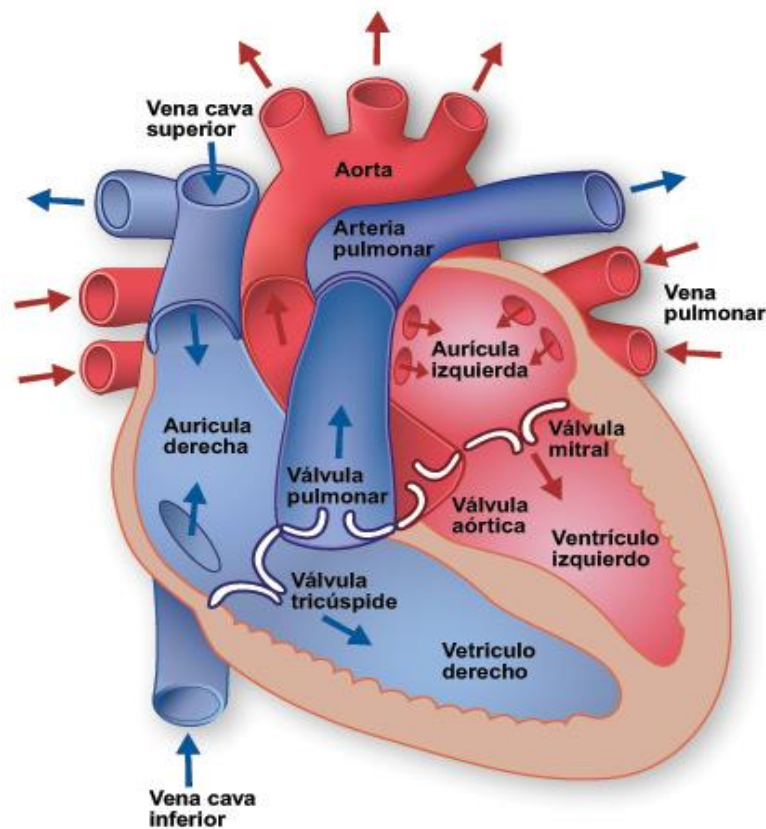


Figura 2.- Anatomía del Corazón. Se observan los ventrículos, aurículas, válvulas, venas y arterias [11].

2.1.1.1.1 Ventrículo izquierdo

Forma el vértice o ápex del corazón. Al igual que el ventrículo derecho, contiene trabéculas carnosas y cuerdas tendinosas que conectan la válvula mitral a los músculos papilares. Cuando la sangre sale del ventrículo izquierdo, pasa por la válvula aórtica hacia la aorta ascendente. Desde esta arteria sale la irrigación para todo el cuerpo, incluyendo las arterias coronarias que irrigan al corazón. Las válvulas tricúspide y mitral reciben el nombre de válvulas atrioventriculares o auricoventriculares (AV). Las válvulas pulmonar y aórtica reciben el nombre de válvulas semilunares.

La pared muscular del ventrículo izquierdo es considerablemente más gruesa que la del derecho porque debe realizar un trabajo más intenso: bombear sangre a sectores más distantes como la cabeza y los miembros inferiores [12].

Existen ciertas diferencias estructurales entre el músculo de los ventrículos y de las aurículas. Las células musculares de las aurículas son más pequeñas y vecinas al núcleo en asociación con complejos de Golgi presentes en esa zona se observan gránulos de unos 0.4 μ m de diámetro que contienen el factor natriurético auricular, auriculina o atriopeptina.

2.1.1.2 Vasos Sanguíneos

Son conductos musculares, tubulares y elásticos que distribuyen y recogen la sangre de todos los rincones del cuerpo. Los vasos sanguíneos se clasifican en tres grupos:

- *Arterias*

Llevan la sangre desde el corazón a los órganos, transportando el oxígeno (excepto en las arterias pulmonares, donde transporta sangre con dióxido de carbono) y los nutrientes. Esta sangre se denomina arterial u oxigenada en la circulación mayor y tiene un color rojo intenso. Tienen las paredes gruesas y ligeramente elásticas, pues soportan mucha presión. La musculatura de sus paredes les permite contraerse y dilatarse para controlar la cantidad de sangre que llega a los órganos.

Existen distintos tipos de arterias de acuerdo a las diferencias funcionales que presentan y las características de la túnica media, estas son 3:

- a) Arterias elásticas (Arterias de Conducción), de gran calibre y cercanas al corazón
- b) Arterias musculares (Arterias de Distribución).
- c) Arteriolas [11,14].

- *Venas*

Llevan la sangre desde los órganos y los tejidos hasta el corazón y desde éste a los pulmones, donde se intercambia el dióxido de carbono con el oxígeno del aire inspirado, (excepto en las venas pulmonares, donde se transporta sangre oxigenada). Esta sangre se llama venosa y es de color más oscuro. Poseen válvulas unidireccionales que impiden el retroceso de la sangre.

- *Capilares*

Tienen su origen en la división progresiva de las arterias en ramas cada vez más pequeñas hasta llegar a los vasos capilares, que poseen finísimas paredes, y a través de los cuales pasan las células sanguíneas, al igual que los gases respiratorios, los nutrientes y el resto de las sustancias que transporta la sangre.

Las paredes de los vasos sanguíneos poseen una estructura general de 3 capas o túnicas. Sin embargo estas capas no siempre presentan una definición tan clara como lo indica su descripción, estas capas se clasifican de la siguiente forma:

- a) Capa o túnica íntima, que es la más interna, cuyos componentes principales son el endotelio lindante con la luz, una capa delgada de tejido conjuntivo subendotelial y la membrana elástica interna.
- b) Capa o túnica media, la intermedia, que consiste sobre todo en células musculares lisas de organización predominantemente circular y fibras del tejido conjuntivo.
- c) Capa o túnica adventicia, que es la externa, la cual está compuesta por fibrillas colágenas de curso longitudinal, muchas fibras elásticas y fibroblastos, se continúa sin límites nítidos con el tejido laxo continuo [15].

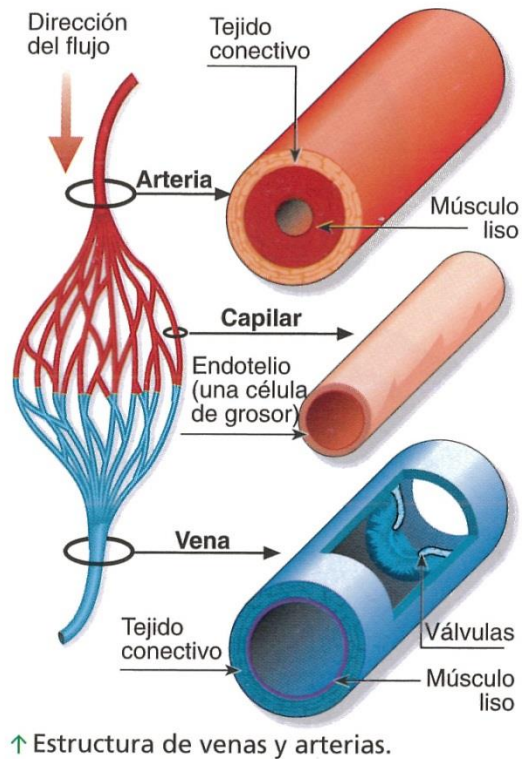


Figura 3.- Estructura de los vasos sanguíneos. Representación general de las capas que conforman a cada tipo de vaso [14].

La mayor parte de las arterias van acompañadas por un nervio y una o dos venas formando una relación vasculo-nerviosa cubierta por tejido conectivo. En algunas personas las paredes arteriales se endurecen perdiendo y dando lugar a la condición de arteriosclerosis o aterosclerosis.

2.1.1.2.1 Aorta

Es la principal arteria del cuerpo humano, originada de la porción superior del ventrículo izquierdo, algo a la derecha y atrás del tronco pulmonar; distribuye por todo el organismo la sangre de la circulación sistémica. Posee paredes gruesas y resistentes con una gran cantidad de láminas elásticas fenestradas. Durante la sístole cardíaca se distienden y en la diástole, las fuerzas de retroceso de la elastina contribuyen a impulsar la sangre hacia adelante en forma normal, y así no se interrumpa el flujo [8,15].

Recibe su nutrición tanto desde la luz como desde pequeños vasos especiales que entran en la pared arterial desde afuera.

La estructura de la pared de la aorta es la siguiente:

Íntima: está compuesta de células endoteliales, lámina basal y una delgada capa de tejido conjuntivo laxo con fibrocitos.

Media: contiene una gran cantidad de láminas de elastina y células de músculo liso en menor cantidad que en arterias de tipo muscular.

Adventicia: relativamente delgada y compuesta de fibroblastos, fibras de colágeno y una red laxa de fibras elásticas [14].

De acuerdo con el trayecto de la aorta se describen los siguientes 3 fragmentos:

- Aorta Ascendente
- Arco Aórtico
- Aorta Descendente, esta se subdivide en 2 partes, de acuerdo a su ubicación:
 - a) Torácica
 - b) Abdominal

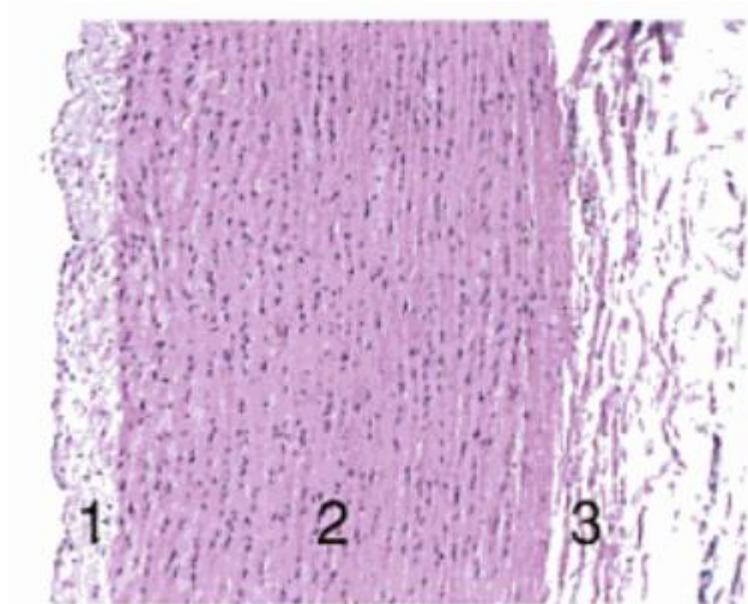


Figura 4.- Corte de la aorta teñido con H-E; 100X. 1) Túnica íntima, 2) Túnica Media, 3) Túnica Adventicia. [9,14].

2.1.2 Fisiología del Aparato Circulatorio

La circulación sanguínea es vital para el mantenimiento de la vida, ya que sin movimiento sanguíneo por el cuerpo, no existe ni la más remota posibilidad de sobrevivir un tiempo más allá de unos pocos minutos. El sistema cardiovascular es similar a un circuito hidráulico cerrado, formado por un fluido, una bomba de impulsión del fluido, y una red de conductos que llevan y traen el fluido en circuito cerrado a la bomba. En tal circuito físico existen tres magnitudes físicas básicas estrechamente relacionadas entre sí: el flujo, la resistencia y la presión [8].

2.1.2.1 Regulación Cardíaca

El impulso eléctrico cardíaco se autogenera en el nódulo sinoauricular y se trasmite a todo el corazón a través de las fibras conductoras especializadas, como una onda de despolarización. Los impulsos transmitidos y las contracciones que generan deben realizarse de forma rítmica y coordinada. Si existen anomalías en estos procesos pueden promover a la aparición de arritmias cardíacas.

El gasto cardíaco, es el volumen de sangre bombeada por minuto, depende en gran medida de la intensidad de flujo venoso que retorna al corazón y varía según las necesidades fisiológicas y el volumen corporal, por lo que puede aumentar considerablemente por ejercicio intenso. Por ello el corazón posee una autorregulación intrínseca y debe adaptarse en cada momento a la cantidad de sangre que recibe por las venas.

Otro mecanismo básico de regulación es el control del reflejo del sistema nervioso autónomo. El corazón está inervado tanto por fibras simpáticas como por fibras parasimpáticas; por estimulación parasimpática disminuyen la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción, mientras que la simpática la aumenta hasta un cierto límite [11,16].

2.1.2.2 Regulación de la Presión arterial

La presión sanguínea es la fuerza ejercida por la sangre contra las paredes vasculares por unidad de superficie. Depende del flujo sanguíneo, equivalente al gasto cardíaco, y de las resistencias periféricas que se oponen a él, especialmente la ejercida por las arteriolas.

A medida que el ventrículo izquierdo se contrae y expulsa la sangre, la presión en la aorta crece estirando las paredes de esta arteria flexible hasta que la presión alcanza su pico. Al pico de presión se le llama presión sistólica y promedia 120 mmHg en los adultos sanos. La sangre se mueve hacia los lechos capilares, debido a que la presión en la aorta es mayor que en estas últimas estructuras distales. Cuando se produce a continuación la diástole, las válvulas semilunares aórticas se cierran para prevenir que se produzca contraflujo de sangre al interior del corazón, esto hace que las paredes de la aorta (y otras arterias) retrocedan y con ello mantengan una adecuada presión para que continúe fluyendo la sangre al sistema. Durante ese tiempo la presión en la aorta baja a su nivel menor, unos 80 mmHg, lo que se conoce como presión diastólica [8,17].

El control continuo de la presión sanguínea se ejerce por el sistema nervioso autónomo, específicamente por el sistema simpático. Los impulsos recibidos tanto por receptores de las arterias carótidas y en la aorta, como por los centros cerebrales superiores, se transmiten a través del hipotálamo al sistema nervioso autónomo, que responden modificando la frecuencia cardíaca y la resistencia de los vasos, alterando de esta forma la intensidad de riego sanguíneo en los tejidos [16, 18].

	Presión Sistólica (PS)	Presión Diastólica (PD)
<i>Hombres</i>	124.8	79.9
<i>Mujeres</i>	120.7	76.9

Tabla 1.- Promedio de la Presión arterial en personas sanas de acuerdo al sexo en México [1].

2.2 Sistema Renina Angiotensina

El Sistema Renina Angiotensina (SRA) es considerado un sistema endocrino cuyos metabolitos activos tienen una amplia variedad de funciones en diferentes órganos y tejidos.

El papel fisiológico del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) fue originalmente esbozado por Tigerstadt y Bergman, en 1989 [19], al aislar un extracto de la corteza renal del conejo que provocaba hipertensión arterial sostenida cuando se lo administraba en forma endovenosa. Concretaron así uno de los avances más importantes de la fisiología médica. El compuesto presor, en un inicio no identificado, fue llamado renina, pero la gran cantidad de implicancias fisiopatológicas que el mismo tenía no fue vislumbrada hasta las descripciones de Goldblatt, en 1937 [20], de la hipertensión experimental inducida por isquemia renal.

El SRA clásicamente se ha descrito como un sistema circulante con un solo punto de terminación, la generación de Angiotensina II que posee el papel más importante en la regulación de la presión sanguínea y de los fluidos, además del balance de electrolitos por unión a sus receptores [21].

2.2.1 SRAA y la Presión Arterial

Una forma de control de la presión sanguínea a más largo plazo se ejerce a través de un mecanismo renal: primero, al disminuir la irrigación del riñón y al disminuir la filtración glomerular por efecto de una presión arterial baja, se retiene agua y electrolitos, y por consiguiente, el volumen sanguíneo aumenta y la presión sanguínea se eleva. En segundo lugar, la disminución de la presión sanguínea en la arteriola aferente del glomérulo provoca, en las células yuxtaglomerulares, la formación de Renina, que a su vez desencadena la formación de Angiotensina II. Esta última sustancia tiene efecto vasoconstrictor en el músculo liso arteriolar de todo el organismo, por lo que aumenta considerablemente la resistencia periférica total.

Por otro lado, la Angiotensina II provoca la secreción de Aldosterona en la corteza suprarrenal. La Aldosterona hace que los riñones retengan el ion sodio y agua, por lo que provocan que el volumen de líquido extracelular y sanguíneo aumente, y con ello la presión arterial. En el caso contrario, una presión arteriolar excesiva determina la pérdida de líquido extracelular a través del riñón, generando una disminución del volumen sanguínea y, por tanto, de la presión arterial [16].

2.2.2 Angiotensinógeno

Es una proteína expresada en el hígado y secretado a plasma, también conocida como Antitripsina α -1 Antiproteasa, pertenece a la familia de las Serpinas, es un miembro no inhibidor de serin-proteasas, posee un tamaño de 485 aa y un peso de 53154 Da; participa como un componente esencial del SRA [22].

El gen que lo codifica se encuentra en la localización cromosomal 1q42.2 y posee una longitud de 2587 pares de bases (bp), posee una homología con la clase de los vertebrados, entre ellos con *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* [23,24].

Dentro de los genes del RAS ha sido el del angiotensinógeno (AGT) el primero y el más ampliamente estudiado, dado que existen varias observaciones compatibles con una relación directa entre el AGT y la presión arterial [25].

Los esteroides, algunas citocinas circulantes (interleucinas, factor de necrosis tumoral-* [TNF-*]), el NF- κ B y la propia Angiotensina II, aumentan la síntesis hepática de Angiotensinógeno [26,27].

2.2.3 Renina

La renina es una proteasa de 40.000 Da de peso molecular, sintetizada, almacenada y secretada por las células de la arteriola aferente próximas al polo vascular del glomérulo renal en íntimo contacto con la mácula densa sensible a la sal. El primer producto derivado del *ARNm* de la renina es la preprorenina, la cual es procesada en el retículo endoplásmico a prorenina. La prorenina constituye el 80-90% de la renina en el plasma humano y, para convertirse en renina activa, requiere captación tisular [28,29].

La prorenina es un zimógeno catalíticamente inactivo que se une al RPR e induce un incremento en la conversión catalítica de Angiotensinógeno a Ang I. Además, la unión de la pro-renina a su receptor genera una cascada de señales intracelulares asociadas con la activación de la proteincinasa asociada a mitógenos (MAPK), la cinasa reguladora de señales extracelulares tipo 1 y 2 (ERK 1/2) y la fosforilación de la proteína de choque térmico²⁷ (HSP27), con llevando a un aumento en la síntesis de ADN, colágeno tipo 1, fibronectina y factor de crecimiento transformador β -1 (TGF- β 1), los cuales son conocidos como mediadores en procesos de fibrosis y remodelado en varias enfermedades. Estos descubrimientos han abierto las puertas a un nuevo grupo de medicamentos inhibidores directos de la renina [30,31, 32].

La renina no tiene un efecto fisiológico directo, sino que actúa sólo sobre el angiotensinógeno, que es una *2-glucoproteína circulante producida por el hígado, para generar el decapeptido Angiotensina-I. La renina tiene una vida media en plasma de 10-15 min y es aclarada por el hígado [27].

2.2.4 Angiotensina II

La Ang I es transformada en Angiotensina II (1-8), la cual es un octapeptido, por medio de la ECA. Fue aislada por primera vez en 1940 por Braun-Menendez y cols., en un principio fue caracterizada como un potente vasoconstrictor que incrementa la resistencia vascular periférica y en consecuencia eleva la presión arterial [33].

En situaciones de depleción del volumen extracelular la Ang II reduce la excreción renal de sodio y agua alterando la hemodinámica renal y además estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal la cual provoca mayor reabsorción hidrosalina a nivel del túbulo contorneado distal y del túbulo colector. De esta manera la Ang II regula la presión arterial de forma directa al aumentar la resistencia vascular periférica y de forma indirecta al aumentar el volumen sistólico y por ende el gasto cardíaco [34].

Secuencia AngII: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

La Ang II es la principal hormona efectora del sistema renina-angiotensina con una vida media de sólo 1-2 min y es inactivada por las aminopeptidasas presentes en muchos tejidos y en altas concentraciones en los hematíes. No obstante ésta no es la única vía de síntesis de angiotensina-II [35,36]. Sistemas enzimáticos no dependientes de la renina sintetizan angiotensina-II a partir del angiotensinógeno, o a partir de la angiotensina-I en el caso de la quimasa, abundante en el miocardio y en las arterias, de tal forma que, tras la administración crónica de un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA), los valores de angiotensina-II tienden a la normalidad debido a estos sistemas alternativos [37,38].

Una serie de aminopeptidasas convierten la angiotensina-II en péptidos con menor número de aminoácidos (fig. 1), algunos biológicamente activos. Así, la angiotensina-III (Ang-[2-8]), heptapéptido, estimula la aldosterona y el sistema nervioso central (SNC) (sed, vasopresina y catecolaminas), la Angiotensina-IV, hexapéptido, aumenta el flujo plasmático renal, y la Ang-(1-7) tiene un efecto vasodilatador, natriurético e inhibidor del crecimiento del músculo liso vascular [39,40].

La Ang II es un péptido excitador del simpático con efectos en diferentes focos que incluyen el hipotálamo y el bulbo, la médula espinal, los ganglios simpáticos, y las terminaciones nerviosas. A nivel central genera efectos sobre el volumen minuto (VM) y la presión arterial. En animales de experimentación con IC la expresión de uno de sus receptores, el AT1, está marcadamente aumentada en el bulbo (zona rostro-ventro-lateral). Aparentemente los altos niveles de Ang II provocan regulación hacia arriba de sus receptores (ver más adelante); son efectos importantes su vinculación con la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) y la facilitación de la transmisión simpática [41].

También es un potente factor de crecimiento y un importante mediador endógeno de hipertrofia cardiovascular, también es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en los tejidos cardiacos a través de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B); los niveles de este péptido se encuentran elevados en las SHR [35,39].

2.2.5 Receptor AT1

El AT1 es un receptor con 7 dominios transmembranales, del tipo acoplado a la proteína G (GPR), que interviene en múltiples caminos de señalamiento intracelulares que comprenden al calcio, fosfolípidos, cinasas y radicales libres derivados del oxígeno, fue identificado en 1974 como un receptor de membrana con alta afinidad por la Ang II [42].

Los AT1 se encuentran en las glándulas suprarrenales, en el cerebro, en el riñón, en el músculo liso vascular y en el corazón. En la vasculatura están presentes en gran número en las células musculares lisas, y en baja cantidad en la adventicia. Ambos receptores difieren en cual proteína G ellos activan preferencialmente y en la variedad de señales que inician [43].

Los receptores AT1 se expresan en todos aquellos órganos que participan en la regulación de la presión arterial. En el sistema vascular su estimulación produce intensa vasoconstricción. En el riñón la activación del receptor provoca vasoconstricción y aumento de la reabsorción tubular de sodio, mientras que en la suprarrenal induce liberación de aldosterona, quien también promueve retención de sodio. Los receptores AT1 en el cerebro intervienen en las respuestas vasopresoras, pero también en la regulación de la sed, apetito para la sal y liberación de arginina vasopresina [44].

La estimulación del receptor AT1 activa múltiples cascadas de señalamiento, principalmente a través de las MAPK, inositol-trifosfato (IP3) y fosfolipasa C e inhibe la adenilciclase, mediando vasoconstricción, reabsorción de sodio, hipertrofia y proliferación celular, fibrosis tisular y reacción inflamatoria [45].

En años recientes se ha descrito que los receptores AT1 están conectados a vías de señalización usualmente asociadas con factores de crecimiento y receptores de citoquinas. Esto ocurre principalmente a través del acoplamiento del receptor AT1 a la transactivación del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) el cual interviene en eventos celulares tales como crecimiento, proliferación y migración celular [34].

Estudios han demostrado que la Ang II, al actuar sobre su receptor AT1, produce activación de metaloproteasas de matriz (MMP) las cuales liberan factor de crecimiento epidérmico (EGF) que activa a su vez a su receptor (EGFR), lo cual lleva a la activación de la ERK 1/2, activando la mTOR/S6K-1 que producen fosforilación de los residuos de serina del IRS con la posterior desensibilización de la señal PI3K de la insulina, induciendo así a través de este complejo mecanismo resistencia a la insulina [46,47].

2.2.6 Receptor AT2

El AT2 es una proteína integral de la membrana que pertenece a la familia de los receptores asociados a proteína G, están presentes principalmente en tejidos fetales, disminuyendo rápidamente después del nacimiento, encontrándose en baja cantidad en los tejidos de los adultos [48].

Los efectos vasodilatadores del AT2 son mediados a través de la cascada bradicinina-NO-GMPc; y el de formación de ácido araquidónico por medio de la activación de las protein-fosfatasa que desfosforilan proteínas y estimulan a la fosfolipasa A2. Cuando hay disminución del Na⁺ plasmático o estenosis de arteria renal, así como cuando hay un bloqueo del receptor AT1 en diabéticos hipertensos, se incrementa la expresión del AT2 generando vasodilatación. Se han señalado cuatro caminos de señalamiento a partir del AT2, estos son: 1) activación de fosfatasa proteínicas y desfosforilación proteica; 2) regulación del sistema bradicinina-NO-GMPc; 3) activación de la fosfolipasa A2 y liberación de ácido araquidónico; y 4) formación de ceramida [49].

La unión de Ang II a su receptor AT2 produce la inhibición el crecimiento celular e induce apoptosis, además de que participa en la inhibición de la proliferación de células endoteliales coronarias, inhibición de neointima y diferenciación celular. También podrían estar vinculados al remodelado ya que IM. Henrion y col. han comunicado que la estimulación del receptor AT2 (*in vitro*) induce la producción de NO, o sea efecto vasodilatador. En la condición citada la estimulación de AT2 inhibe el crecimiento y proliferación del músculo liso vascular y cardíaco, estimula apoptosis, y promueve síntesis de la matriz extracelular [50].

2.2.7 Bradicinina

La bradicinina es un péptido con una cadena de 9 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos es: Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg. Fue descubierta en 1948 por tres fisiólogos y farmacólogos brasileños que trabajan en el Instituto Biológico, en San Paulo, Brasil, dirigido por el Dr. Mauricio Rocha Silva. Junto con sus colegas Wilson Teixeira Beraldo descubrió los potentes efectos hipotensores de bradicinina en preparaciones de animales [51].

La BK produce que los vasos sanguíneos se dilaten, y por lo tanto hace que disminuya la presión arterial. Una clase de medicamentos llamados inhibidores de la ECA, que se usan para bajar la presión arterial, aumenta la presión arterial mayor disminución bradicinina. Obras bradicinina sobre los vasos sanguíneos a través de la liberación de prostaciclina, óxido nítrico, y la hiperpolarización Factor derivado del endotelio [52].

La bradicinina deriva del cininógeno de alto peso molecular mediante la acción de la calicreína plasmática, que resulta de la activación del sistema de contacto. Su elevación aumenta la permeabilidad vascular, la extravasación de plasma hacia el espacio intersticial del tejido subcutáneo o submucoso y también se encuentra involucrada en el mecanismo del dolor. La bradicinina provoca también la natriuresis, contribuye a una disminución de la presión arterial. Por otra parte, los IECAs aumentan el nivel de bradicinina por disminución de su catabolismo [53].

El receptor B1 se expresa sólo como resultado de la lesión de los tejidos, y se presume que desempeñar un papel en el dolor crónico. Este receptor se ha descrito también jugar un papel en la inflamación. Más recientemente, se ha demostrado que el receptor B1 de cinina recluta neutrófilos a través de la producción de quimioquinas CXCL5. Por otra parte, las células endoteliales se han descrito como una fuente potencial de esta vía de los receptores B1-CXCL5. El receptor B2 se expresa constitutivamente y participa en la función vasodilatadora de la bradicinina. Los receptores B1 y B2 pertenecen a la familia de receptores acoplados de proteína G [54,55].

2.2.8 Enzima Convertidora de Angiotensina

Es una metaloproteasa de Zinc de dos dominios perteneciente a la familia de la peptidasas M2, también se le denomina cininasa II, posee 1306 aa y un peso de 149 715 Da, su localización cromosomal en humanos es 17q.23.3, su *ARNm* en humanos es de 4020 bp- Como su nombre lo dice, se encarga de catalizar la liberación del dipéptido C-terminal de Ang I (1-10) para formar Ang II (1-8), [56,67].

El papel de la ECA dentro del SRA está bien establecido desde los trabajos pioneros de Skeggs y cols. en el año 1956, los cuales demostraron que la ECA constituía la enzima clave en la generación de Ang II [58]. Se une a dos iones zinc (Zn) y tres iones cloruro (Cl) por subunidad, a excepción de la isoforma testicular solo se une a 1 ion Zn por subunidad. Se encuentra en la mayoría de los tejidos y es expresada principalmente por células epiteliales, endoteliales y neuroepiteliales, pero sus niveles son mayores en riñón, pulmón, corazón, sistema gastrointestinal, próstata y útero. Posee una isoforma específica de testículos que se expresa en espermatozoides y testículos adultos. En las glándulas suprarrenales se encuentra en la medula, donde se cree que estimula la secreción de catecolaminas [56, 59].

La ECA sufre de una modificación post-transcripcional al ser fosforilada por CK2 en Ser-1299, lo cual permite su retención en la membrana, por ello la ECA existe en el organismo en dos formas: como complejo soluble circulante en el plasma y como ECA tisular, localizada tanto en el endotelio como en la pared vascular o en el miocardio. La mayor parte de la ECA circulante se origina en células endoteliales y macrófagos [60,61].

Otras de las actividades de esta enzima resultan en: la participación en el sistema de la Caliceína-cinina por la degradación de la bradicinina y también posee actividad como glucosidasa mediante la cual libera proteínas ancladas a GPI de la membrana por la ruptura del enlace manosa en GPI [58]. Asimismo, la ECA y AngII se han demostrado involucradas en el desarrollo de lesiones arteriales [60].

Existen 3 isoformas de la ECA en el organismo:

1) ECA somática: es una glucoproteína de 170KDa que se encuentra en varios tejidos (vasos sanguíneos, riñones, corazón y cerebro principalmente). Es una ectoenzima bilobulada unida a la membrana celular y que tiene una región hemodimérica extracelular, la cual a su vez tiene 2 dominios homólogos con un sitio catalítico activo cada uno (Sitio activo N-terminal y sitio activo C terminal), un dominio de anclaje transmembrana y una cola corta de carboxilo intracelular. El sitio C terminal es el responsable del 75% de la actividad de la ECA y el principal responsable de la conversión de la Ang I a Ang II [62].

B) ECA testicular o germinal: es una glucoproteína de 90 KDa que se encuentra exclusivamente en las células germinales de los testículos, surge por *splicing* alternativo del gen de la ECA, y se diferencia a la ECA somática en que sólo tiene un amino terminal en la región extracelular y por lo tanto tiene un sitio catalíticamente activo [63].

C) ECA plasmática o soluble: deriva de la segmentación proteolítica de la región C-terminal de la ECA somática desde la membrana celular y carece del dominio transmembrana en la porción intracelular; por lo tanto, la ECA soluble corresponde a la región extracelular de la ECA somática y contiene 2 sitios activos [64].

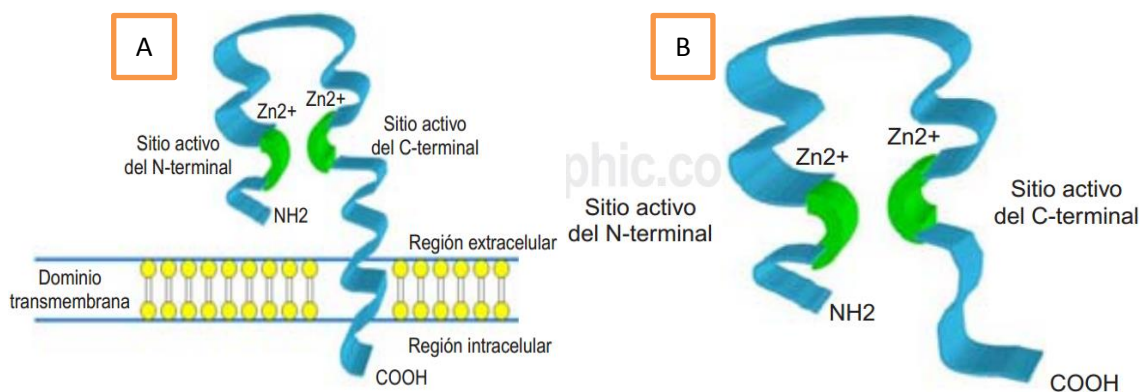


Figura 5.- A) Isoforma 1 tipo somática [2]. **Figura 6.-** B) Isoforma 1 tipo plasmática [2].

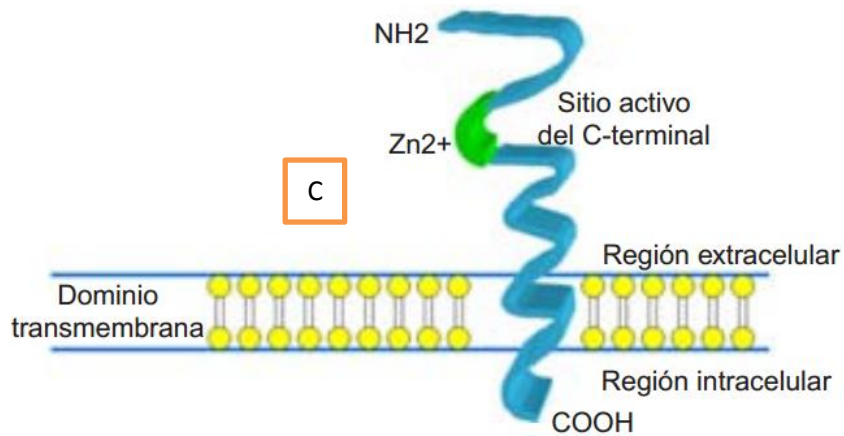


Figura 7.- C) Isoforma 2 tipo testicular. [2].

2.2.9 Enzima Convertidora de Angiotensina II

Es una carboxipeptidasa que al igual que la ECA pertenece a la familia de las peptidasas M2, su estructura está conformada por 805 aa y pesa 92 463 Da. Se une a un ion Zn y Cl por subunidad; la enzima es activada por cloruros y fluoruros pero no bromuros. Su pH óptimo es de 6.5 en presencia de 1M de NaCl y se encuentra activa dentro del rango de pH de 6-9. Su localización cromosomal es Xp22.2 y el *ARNm* que codifica para esta enzima es de 2599 bp [65,66].

En el año 2000, dos grupos independientes identificaron una nueva enzima homóloga de la ECA, a la cual denominaron enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2). Entre las características más resaltantes de esta enzima, es que es una zinc-metaloproteasa [40,41], que tiene una secuencia 42% idéntica y 61% similar a la ECA, pero ambas realizan actividades bioquímicas diferentes; por otra parte, la ECA-2 tiene un dominio de unión al zinc HEXXH, el cual es homólogo al sitio activo de la ECA, pero que no es afectado por sus inhibidores (IECA) [67].

La ECA 2 al hidrolizar a la Ang I genera Angiotensina (1-9), la cual sirve como una vía indirecta para generar Ang II; sin embargo, la actividad catalítica de la ECA2 es 400 veces

mayor sobre la Ang II que sobre la Ang I, y conlleva a la formación de Ang (1-7) a partir de la Ang II con propiedades vasodilatadoras [68].

Se expresa en células endoteliales de pequeñas y grandes arterias, en células de músculo liso arterial, células epiteliales del pulmón, enterocitos de intestino delgado, células de Leydig y células de Sertoli, además de que se expresa en riñón y corazón [69].

Otras de sus funciones son su capacidad de hidrolizar apelina-13 y dinorfina-13 con alta eficiencia. Se considera como un importante regulador de la función cardíaca. En el caso de las infecciones por coronavirus humanos SARS y HCoV-NL63, la ECA2 sirve como receptor funcional para las glicoproteínas de ambos virus [65,70].

La expresión de ECA2 está significativamente reducida en ratas sensibles a la sal y en ratas espontáneamente hipertensas. La administración de bloqueadores del receptor de Ang II provoca regulación positiva del *ARNm* de ECA2 asociado con aumento de los niveles plasmáticos de Ang-(1-7). Se encontró que la ablación del gen de ECA2 en el ratón produce adelgazamiento de la pared muscular y marcada reducción de la contractilidad, similar a la observable en el atontamiento cardíaco. La ECA2 no hidroliza a la bradicinina [71].

Tanto la inhibición farmacológica de la ECA2, como la supresión genética de esta enzima, conlleva a efectos deletéreos a nivel renal, favoreciendo la albuminuria, la expansión mesangial, cambios en la filtración glomerular y en ocasiones a un incremento de la presión arterial; indicando la importancia que tiene la ECA2 como una enzima renoprotectora, debido a la formación de la Ang 1-7 [69].

De esta manera, el SRA puede ser visto como un sistema endocrino dual en el que las acciones vasoconstrictoras/proliferativas y las acciones vasodilatadoras/antiproliferativas son reguladas en parte por un balance entre la ECA y la ECA2, lo cual hace fácilmente entendible el efecto benéfico que tienen los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) en el perfil de pacientes cardiometabólico.

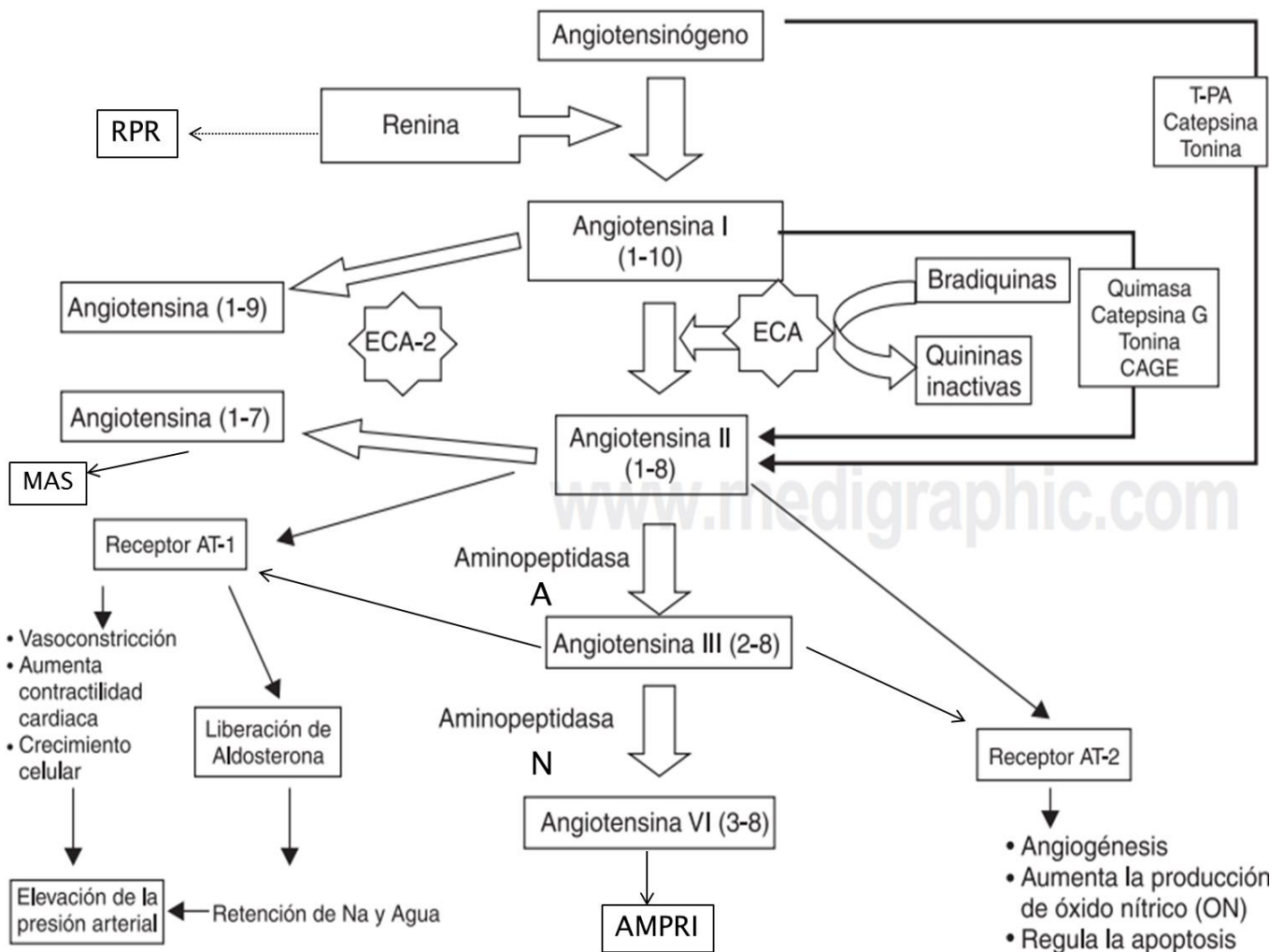


Figura 8.- Esquema General de Sistema Renina Angiotensina. El angiotensinógeno es convertido a angiotensina I mediante la renina, esta es transformada a su vez en angiotensina II por la ECA y esta su vez se convierte en angiotensina III y IV mediante la aminopeptidasa A y N respectivamente. La ECA2 transforma a la angiotensina I en angiotensina (1-9) y a la Ang II en angiotensina (1-7) que puede unirse a su receptor MAS. La Ang II al unirse a su receptor AT1 genera vasoconstricción y libera aldosterona lo que eleva la PA, mientras que por su unión al receptor AT2 aumenta la producción de NO y regula apoptosis [2].

2.3 Hipertensión Arterial

Hipertensión es el término empleado para describir al aumento patológico de la presión sanguínea arterial que usualmente se encuentra por encima de 140/90 mmHg.

La HTA es una enfermedad que representa el principal factor de riesgo para eventos cardiovasculares. Posee una elevada prevalencia, es el principal factor de riesgo de muerte en el mundo y afecta tanto hombres como mujeres, además los costos económicos asociados al tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones representan una carga para los pacientes y los servicios de salud, es por ellos que en años recientes se ha puesto un gran empeño para detectar y tratar pacientes con Hipertensión, ya que se ha convertido en un problema de salud nacional. Cabe destacar que la mayoría de los individuos que la padecen no presentan síntomas [72].

2.3.1 Clasificación

Los pacientes con Hipertensión Arterial (HTA) pueden clasificarse según si éstos presentan o no una etiología clara y evidente ó si tienen o no mecanismos hipertensógenos conocidos, estos son los tipos:

- *Hipertensión esencial*

También conocida como primaria, es la más relevante numéricamente ya que la padecen cerca del 90% de los hipertensos. Se caracteriza principalmente porque sus causas son desconocidas, hasta ahora se sabe que tiene un patrón hereditario que del cual aún el mecanismo exacto no se encuentra del todo dilucidado, pero con mucha frecuencia los individuos que padecen este tipo, poseen antecedentes de hipertensión arterial es uno o varios miembros de la familia.

Por otro lado, la hipertensión arterial esencial puede aparecer en forma aislada o forma parte de un complejo de alteraciones que se encuentran alrededor de la resistencia a la insulina [8,73].

- *Hipertensión secundaria*

Aunque la hipertensión arterial secundaria tiene una prevalencia baja sobre el total de pacientes hipertensos (5-15%), su importancia radica en la posibilidad de su erradicación, ya que se conocen sus mecanismos fisiopatológicos y las causas responsables, se nombran de acuerdo a su origen:

- a) Renal.- es la más frecuente de las secundarias y es causada por estenosis de la arteria renal, glomérulo nefritis crónica, esclerosis renal pielonefítica y nefropatía gravídica.
- b) Endocrina.- ocasionada por Síndrome de Cushing, de Conn, Hipertiroidismo y Feocromocitoma.
- c) Cardiovascular.- Surge por esclerosis o insuficiencia valvular aórtica y síndrome cardiaco hiperkinético.
- d) Neurógena.- Generada por encefalitis, meningitis, tumores cerebrales, intoxicación por monóxido de carbono o por compuestos de talio [8,74].

- *Hipertensión maligna*

Es una hipertensión arterial rápidamente progresiva caracterizada, desde el punto de vista anatomopatológico, por lesiones arteriolas graves y clínicamente por la existencia de presión arterial muy elevada, hemorragias, exudados retinianos y a menudo aunque no necesariamente, edema de papila. Las cifras de PA suelen ser superiores a 120 mmHg de diastólica y el concepto de rápidamente progresiva nos indica que de no tratarse cuidadosamente aparecen sucesivas lesiones vasculares en órganos diana que condicionan el pronóstico de la enfermedad y puede llegar a ser fatal. Constituye una verdadera urgencia médica requiriendo la administración de fármacos por vía parenteral. [75].

Este tipo es el más raro y solo ocurre a 1 de cada 200 personas que padecen hipertensión, principalmente en varones de raza negra [76].

<i>Categoría</i>	<i>Presión Sistólica</i>	<i>Presión Diastólica</i>
Normal	120-129 mmHg	80-84 mmHg
Hipertensión Etapa 1	140-159 mmHg	90-99 mmHg
Hipertensión Etapa 2	160-179 mmHg	100-109 mmHg
Hipertensión Etapa 3	≥ 180 mmHg	≥ 110 mmHg
Hipertensión Sistólica Asilada	≥ 140 mmHg	< 90 mmHg

Tabla 2.- Clasificación de la Hipertensión Arterial para su diagnóstico [77].

2.3.2 Etiología

La presión arterial (PA) resulta de la interacción de factores genéticos y factores ambientales. Estos últimos modulan la predisposición subyacente debida a la herencia y a determinados factores que aparecen durante la maduración fetal. En unos individuos predomina el peso genético, mientras que en otros los factores ambientales.

- *Historia familiar*

La historia familiar de hipertensión predice de forma significativa la afectación futura por la hipertensión en miembros de esa familia. La fuerza de la predicción depende de la definición de historia familiar positiva y del sexo y la edad de la persona en riesgo: es mayor el riesgo de padecerla cuantos más familiares de primer grado la presenten, cuando la presentaron a edad más temprana, cuanto más joven es el sujeto en riesgo, y para la misma definición y edad, siempre mayor en las mujeres [78].

- *Papel de la genética*

Los estudios de familias han indicado que menos de la mitad de las variaciones de la presión arterial en la población general son explicadas por factores genéticos. Hay muchos genes que pueden participar en el desarrollo de hipertensión. La mayoría de ellos están involucrados, directa o indirectamente, en la reabsorción renal de sodio; los más importantes pertenecen al SRA y son:

a) Variantes del gen del angiotensinógeno, que interactúa con la sensibilidad al sodio de la dieta: polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno. Los sujetos con alelo T (genotipo TT) presentan valores elevados de angiotensinógeno en plasma y se ha asociado a HTA. La asociación es menos consistente con las repercusiones vasculares, cardíacas y renales de la HTA [79].

b) Polimorfismos de inserción (I)/delección (D) del gen de la ECA. La delección de una parte del gen que codifica la enzima (genotipo DD) aumenta su actividad. Aunque existen discrepancias sobre su asociación a HTA, sí se ha observado una asociación más constante con las repercusiones vasculares, renales y cardíacas de la misma [80].

c) Gen de la aldosteron-sintetasa: se encuentran mutaciones en los pacientes hipertensos con renina más baja. También es responsable de una forma monogénica de hipertensión con bajos niveles de renina. Se ha asociado a hipertrofia ventricular izquierda y fibrosis miocárdica [81].

d) Gen del receptor tipo I de la Angiotensina II.

e) Gen de la calicreína (enzima que transforma el Cininógeno en bradicinina): variación en el gen que origina disminución del 50% del nivel de Calicreína con disminución consecuente de bradicinina.

- *Obesidad*

La obesidad ha sido ampliamente reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de HTA. Es común en todas las sociedades desarrolladas y ha sido observada con una alta frecuencia entre niños. Es sabido, que el aumento de la grasa abdominal, se asocia con peores consecuencias metabólicas y se ha relacionado con la dislipemia, la diabetes mellitus (DM) tipo II y con la HTA. El mecanismo por el cual la distribución de la grasa a nivel abdominal provoca un mayor riesgo de HTA no es conocido. Se ha observado que la pérdida de peso se correlaciona con una disminución de las cifras de PA [82].

- *Resistencia a la insulina*

La resistencia a la insulina es un trastorno metabólico que se manifiesta por una reducción en la utilización de la glucosa en el músculo esquelético periférico. El hecho de que ciertos grupos étnicos no presenten asociación entre la resistencia a la insulina y la hipertensión significa probablemente, que están participando tanto mecanismos genéticos como fenómenos ambientales, que contrarrestan la influencia de la insulina. No todos los individuos que presentan resistencia a la insulina son hipertensos y la mayoría de los hipertensos no obesos no presentan resistencia a ella. Sin embargo, ambas alteraciones se presentan juntas con una frecuencia mucho mayor de lo que se esperaría por azar. La insulina favorece la retención renal de Sodio con el consecuente aumento del volumen intravascular, incrementa la actividad del Sistema Nervioso Simpático aumentando las resistencias periféricas y el gasto cardíaco, favorece la proliferación de las células musculares lisas, facilitando la aterogénesis y parece provocar, una alteración en el transporte transmembrana, incrementando la concentración de Calcio intracelular y aumentando la resistencia vascular. Una evidencia a favor de un efecto inductor de hipertensión de la hiperinsulinemia, es el descenso de la PA por el uso de fármacos como las glitazonas, que aumentan la sensibilidad a la insulina y reducen sus niveles.

- *Ingesta de sal*

El aporte excesivo de sodio induce hipertensión por aumento del volumen sanguíneo y de la precarga, lo cual eleva el gasto cardíaco. También puede aumentar la PA mediante otros mecanismos.

La asociación positiva entre aporte de sal e hipertensión arterial está avalada por datos epidemiológicos como la ausencia de HTA en individuos primitivos que no ingieren sodio, la aparición de hipertensión en determinados individuos que adoptan un estilo de vida moderno que incluye mayor aporte de sodio y estudios comparativos entre diferentes países como el estudio INTERSALT; realizado en 52 centros de diversos países, se relacionó la excreción de sodio ajustada por el peso corporal con la pendiente de los niveles de PA diastólica con la edad [83].

En los países con mayor consumo de sodio la pendiente es mayor, indicando la relación entre ambos parámetros, ingesta de sal y PA diastólica. Encontramos también estudios

experimentales en animales y humanos a favor de la participación del exceso de Na^+ en la aparición de HTA como el incremento de la PA en chimpancés genéticamente predispuestos con el aumento progresivo de Na^+ en la dieta y la disminución de la PA observada después de 6 meses y a los quince años en niños a los que se redujo el aporte de Na^+ durante los 6 primeros meses de vida respecto a aquellos con aporte normal [84].

- *Ingesta baja de potasio*

Un bajo contenido de K^+ en la dieta puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de HTA y de accidentes cerebrovasculares. Los mecanismos por los que podría estar relacionado con ambos procesos son inciertos. Los efectos beneficiosos del K^+ pueden ser debidos a la disminución de la respuesta vascular a otros vasoconstrictores (probablemente mediado por favorecer la liberación de NO por el endotelio). También parece existir una relación del K^+ con los cambios en la excreción de Na^+ : la retención de Na^+ inducida por bajos niveles de K^+ en la dieta, contribuye a elevar la PA en 5-7 mmHg en pacientes con HTA. Los suplementos de K^+ tienden a disminuir la PA en pacientes hipertensos así como en normotensos [85].

- *Edad y sexo*

La prevalencia de HTA en el varón aumenta progresivamente hasta la década de los 70 en que se mantiene o aún se reduce ligeramente. En mujeres el incremento mayor se produce en la década de los 50, aumentando progresivamente hasta la década de los 80. La prevalencia es muy elevada para ambos sexos en la década de los 70 y 80 debido especialmente el componente sistólico.

- *Sedentarismo*

Varios estudios han demostrado que el ejercicio regular y la actividad física se asocian con niveles menores de PA y menor prevalencia de HTA. El ejercicio físico previene y reestablece las alteraciones en la vasodilatación dependiente del endotelio que aparecen con la edad. Además del efecto sobre la PA, el ejercicio influye favorablemente sobre determina dos factores que se relacionan con la cardiopatía isquémica como son la reducción del colesterol y

triglicéridos, de la agregación plaquetaria y del peso; aumenta las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la tolerancia a la glucosa [86].

- *Estrés*

El estrés es un estimulante evidente del sistema nervioso simpático. Los individuos hipertensos y los que probablemente presentarán hipertensión sufren mayor estrés o responden a él de una manera diferente. Existen estudios que avalan que las personas expuestas al estrés psicógeno pueden desarrollar hipertensión más frecuentemente que quienes no lo sufren. Incluso en individuos jóvenes sanos se ha demostrado disfunción endotelial transitoria después de experimentar estrés mental. Además la exposición al estrés no sólo puede aumentar la PA por sí sola, sino que también puede generar un aumento del consumo de alcohol y de lípidos [87].

- *Alcohol*

En las pasadas dos décadas, los estudios epidemiológicos han establecido una relación entre el consumo de alcohol y la HTA, en ambos sexos y para todos los tipos de bebidas alcohólicas. Estudios randomizados muestran que la reducción del consumo de alcohol disminuye los niveles de PA tanto en pacientes hipertensos en tratamiento farmacológico como en aquellos que no reciben tratamiento. El consumo excesivo de alcohol debe ser considerado como un posible factor de riesgo para la HTA. Se han descrito varios posibles mecanismos por los que el alcohol media su efecto en la PA:

- a) Aumento de los niveles de renina-Angiotensina y/o de cortisol.
- b) Efecto directo sobre el tono vascular periférico, probablemente a través de interacciones con el transporte del calcio.
- c) Alteración de la sensibilidad a la insulina.
- d) Estimulación del Sistema Nervioso Central.
- e) Depleción de magnesio que podría provocar vasoespasmo e HTA [88].

- *Tabaquismo*

El tabaco puede elevar, de forma transitoria, la PA en aproximadamente 5-10 mmHg. El uso crónico del tabaco no se ha asociado con un incremento de la incidencia de HTA.

Aun así se debe evitar en la población en general, y en hipertensos en particular, ya que aumenta marcadamente el riesgo de enfermedad coronaria y parece estar relacionado con la progresión hacia insuficiencia renal [89].

2.3.3 Epidemiología

La presión arterial por encima de 140/90 mmHg afecta al 30% de la población adulta, una tercera parte desconoce su enfermedad (Figura 9). Uno de cada tres personas que se está tratando por hipertensión no consigue mantener su presión arterial por debajo del límite de 140/90. La información disponible en algunos países, como en los EEUU, revela que mientras la hipertensión arterial es más frecuente en hombres, a partir de edades superiores a los 65 años existe una elevada proporción de mujeres con hipertensión arterial. También se observa una proporción elevada de personas afro-descendientes con hipertensión arterial, que afecta tanto a hombres como a mujeres [90].



Figura 9.- HTA en la población mundial [90].

En los países en desarrollo, muchas personas con hipertensión siguen sin estar diagnosticadas, y se ven así privadas de un tratamiento que podría reducir significativamente su riesgo de defunción y discapacidad por cardiopatía o accidente cerebrovascular.

En la región de África de la OMS, en cambio, se estima que en muchos países más del 40% (y hasta el 50%) de los adultos sufren hipertensión, y esa proporción va en aumento. En la región de las Américas la mortalidad relacionada con la hipertensión arterial se ubica entre las 10 primeras causas de muerte, tanto en hombres como en mujeres [91].

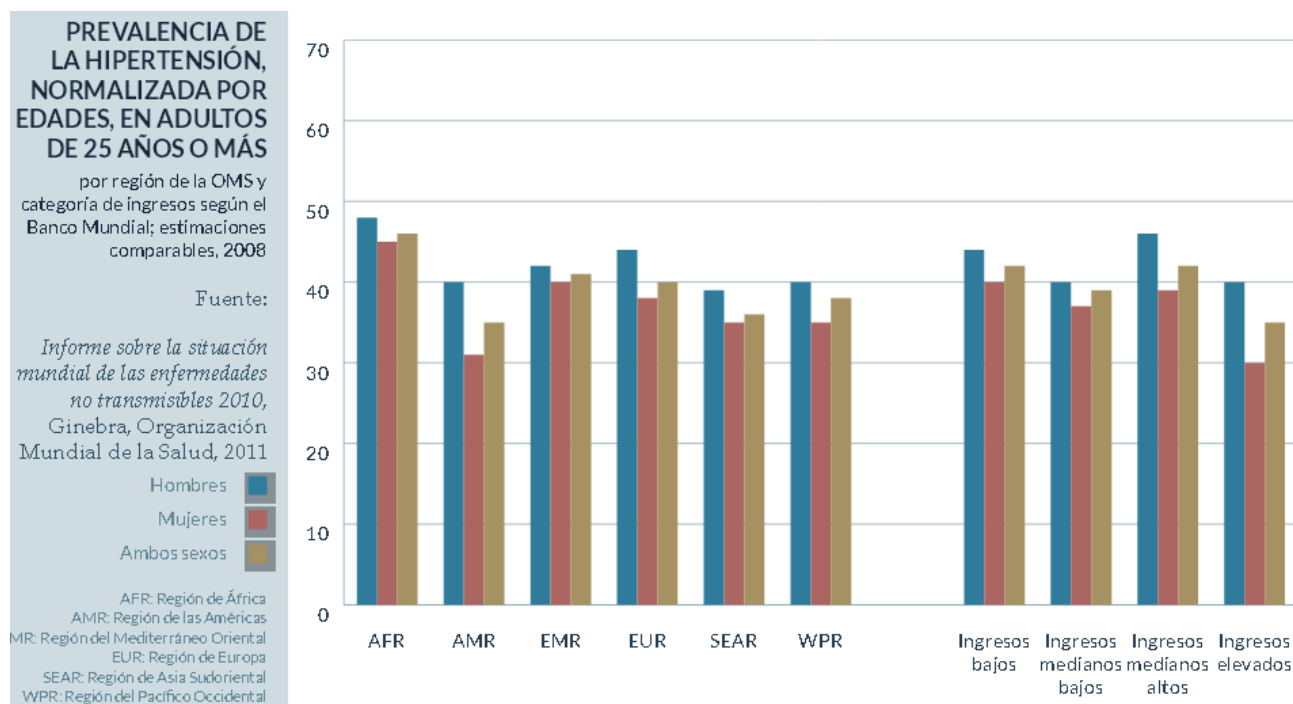


Figura 10.- Prevalencia de la Hipertensión en adultos, por región y por ingresos [91].

Se estima que en México hay 22.4 millones de adultos de 20 años o más que padecen hipertensión arterial, de los cuales únicamente 11.2 millones han sido diagnosticados por un médico. De estos mexicanos que han sido diagnosticados y que están en tratamiento, 5.7 millones presentaron cifras de tensión arterial que pueden considerarse como adecuadas, es decir, mantienen su padecimiento controlado (Figura 11).

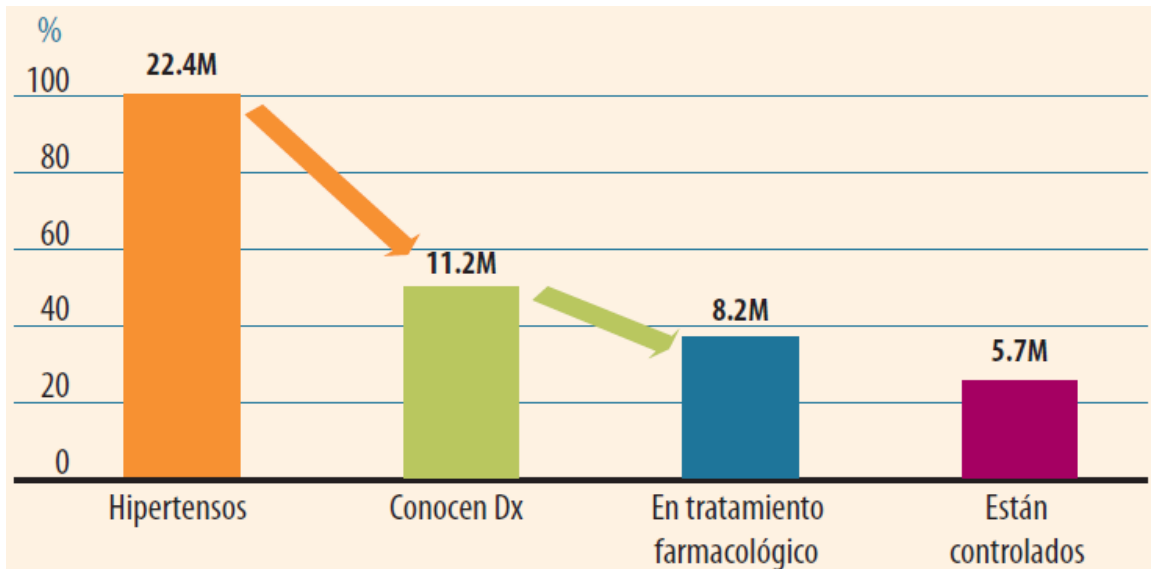


Figura 11.- HTA en México, distribución de acuerdo al diagnóstico, tratamiento y sus resultados (M=Millones de personas) [1].

En México se ha mantenido constante la HTA, en los últimos seis años (Figura 12), tanto en hombres (32.4 frente a 33.3%) como en mujeres (31.1 frente a 30.8%).

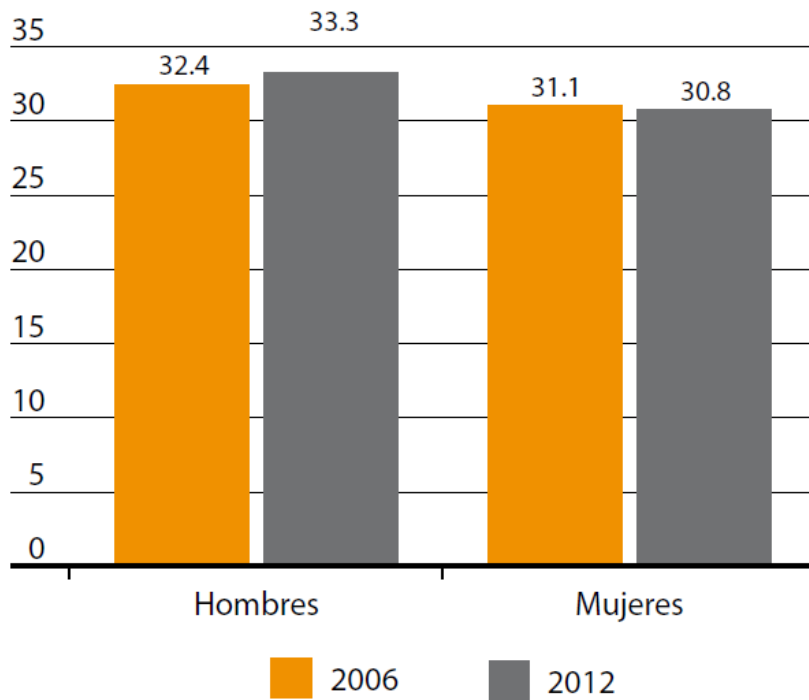


Figura 12.- Prevalencia de HTA por sexo y años de la encuesta [1].

2.3.4 Síntomas y Diagnóstico

- *Síntomas*

La mayoría de los hipertensos no tienen síntomas. Está muy difundida la idea incorrecta de que las personas con hipertensión siempre tienen síntomas, pero la realidad es que la mayoría no los tiene. A veces la hipertensión provoca síntomas como cefalea, dificultad respiratoria, mareo, dolor torácico, palpitaciones o hemorragia nasal. Ignorar estos síntomas puede ser peligroso, pero tampoco se los puede interpretar siempre como indicativos de hipertensión.

- *Diagnóstico*

Para medir la tensión arterial se utilizan dispositivos electrónicos, de mercurio y aneroides. La OMS recomienda el uso de dispositivos asequibles y fiables que ofrecen la opción de realizar lecturas manuales. Los dispositivos semiautomáticos permiten realizar mediciones manualmente cuando se agotan las baterías, un problema que no es infrecuente en entornos con recursos limitados. Como el mercurio es tóxico, se recomienda eliminar progresivamente los dispositivos que lo usan y reemplazarlos por dispositivos electrónicos. Para utilizar dispositivos aneroides, como los esfigmomanómetros, es imprescindible calibrarlos cada seis meses y capacitar y evaluar a las personas que los usen.

Es preciso medir la tensión arterial durante algunos días antes de establecer el diagnóstico de HTA. La tensión se mide dos veces al día, preferiblemente por la mañana y por la tarde. Se toman dos mediciones consecutivas, con un intervalo mínimo de un minuto entre ambas y con la persona sentada. Las mediciones del primer día se descartan, y para confirmar el diagnóstico de hipertensión se toma el promedio de todas las restantes [91].

2.3.5 Tratamiento no Farmacológico

En pacientes con presión arterial normal alta, las modificaciones en el estilo de vida, retrasan la aparición de la enfermedad y su avance.

Es conveniente realizar ejercicio aeróbico de 30-60 min., al menos de 3 a 5 días a la semana (Caminar, trotar, ciclismo, aerobics o natación). En pacientes con sobrepeso y obesidad, por cada 10 kg. de peso perdido disminuye la presión arterial de 5 -10 mmHg.

Los pacientes hipertensos bebedores deben recibir consejo para reducir el consumo de alcohol. El objetivo es reducir al menos el 60% de la ingesta inicial. En bebedores severos (>2 unidades día para la mujer y >3 unidades al día para el hombre), la reducción en el consumo de alcohol disminuye de 3 - 4 mmHg la presión arterial sistólica y diastólica [92].

Se debe recomendar una dieta rica en frutas y verduras con alto contenido de potasio, en todos los pacientes con hipertensión arterial sin insuficiencia renal. El consumo excesivo de café (> 5 tasas al día) incrementa la presión arterial de 1 a 2 mmHg, tanto en pacientes hipertensos como no hipertensos. La reducción de la presión arterial por disminución de ingesta de sodio es de mayor magnitud en pacientes > 45 años que no reciben tratamiento farmacológico. Debe promoverse la suspensión del hábito tabáquico, con la participación de grupos de apoyo y el consejo profesional [93, 94].

2.3.6 Tratamiento Farmacológico

El principal beneficio de la terapia antihipertensiva es debido a la reducción de la presión arterial per se. En la actualidad se cuenta con siete mayores clases de agentes antihipertensivos:

- *Inhibidores de la Renina*

Los inhibidores de renina actúan en el punto inicial de activación del SRAA y, en consecuencia, reducen la formación tanto de Ang I como de Ang II sin afectar al metabolismo de las quininas. La elevada especificidad de la renina por su sustrato, el angiotensinógeno, constituye la base para considerar, a priori, que la inhibición de la renina sea la forma más lógica y atractiva de bloquear el SRAA [95].

Durante los últimos 20 años la investigación sobre esta línea de fármacos ha estado llena de dificultades que han sido superadas con la síntesis de nuevas moléculas con un potente efecto inhibidor de la renina, entre los que se encuentra aliskiren. Recientes ensayos clínicos han demostrado su eficacia antihipertensiva, su excelente tolerabilidad (similar a la del placebo y a la de los ARA II) y su escasa interacción farmacológica con otros fármacos de uso frecuente en clínica. Todo ello permite considerar la inclusión de este nuevo grupo de fármacos en el arsenal terapéutico en la HTA y, posiblemente, en otras indicaciones en patología vascular [96].

- *Beta- bloqueadores*

Un betabloqueante es un fármaco que bloquea el receptor beta adrenérgico, de tal forma que impide la unión de la catecolamina y evita su estimulación. El efecto final es una reducción de la frecuencia cardiaca, la presión arterial y la contractilidad (fuerza del corazón) favoreciendo la diástole (llenado) cardiaca y con esto mejorando la función del corazón y el flujo de sangre a las arterias coronarias [97].

Algunas de sus propiedades farmacológicas son:

- a) La elevada afinidad por el bloqueo de receptores β -1 con respecto a los β -2, esto es dosis dependiente.
- b) Son los de mayor efecto antiarrítmico por su actividad estabilizante de la membrana.
- c) Estos fármacos aumentan la perfusión coronaria durante la diástole, además mejoran el consumo miocárdico de oxígeno por ser bradicardizantes. [98]

- *Diuréticos*

El fundamento del uso de los diuréticos en el tratamiento de la hipertensión se sustenta, en un primer momento, en el incremento de la excreción urinaria de Na^+ , con la consiguiente reducción del volumen extracelular, plasmático y gasto cardíaco; en tanto que la resistencia periférica no se modifica o aumenta. Al cabo de 6 a 8 semanas la liberación de renina y aldosterona, en respuesta a la disminución del volumen plasmático, produce retención de Na^+ y vasoconstricción. De manera que administrándolos en forma crónica estos parámetros se

normalizan. Por lo tanto en una segunda etapa del tratamiento, la acción antihipertensiva de los diuréticos, se fundamenta en la reducción de la resistencia periférica. Este efecto no se produce por la acción directa del diurético sobre el músculo liso vascular, sino que la vasodilatación arterial parece estar asociada con una pequeña, pero persistente reducción del Na^+ corporal. El mecanismo más firme es que la caída de Na^+ en el músculo liso, genera una reducción del Ca^{2+} intracelular, lo que provoca una menor respuesta muscular [99].

Se clasifican en: Tiazídicos, Ahorradores de Potasio, Diuréticos del Asa (Figura 13).

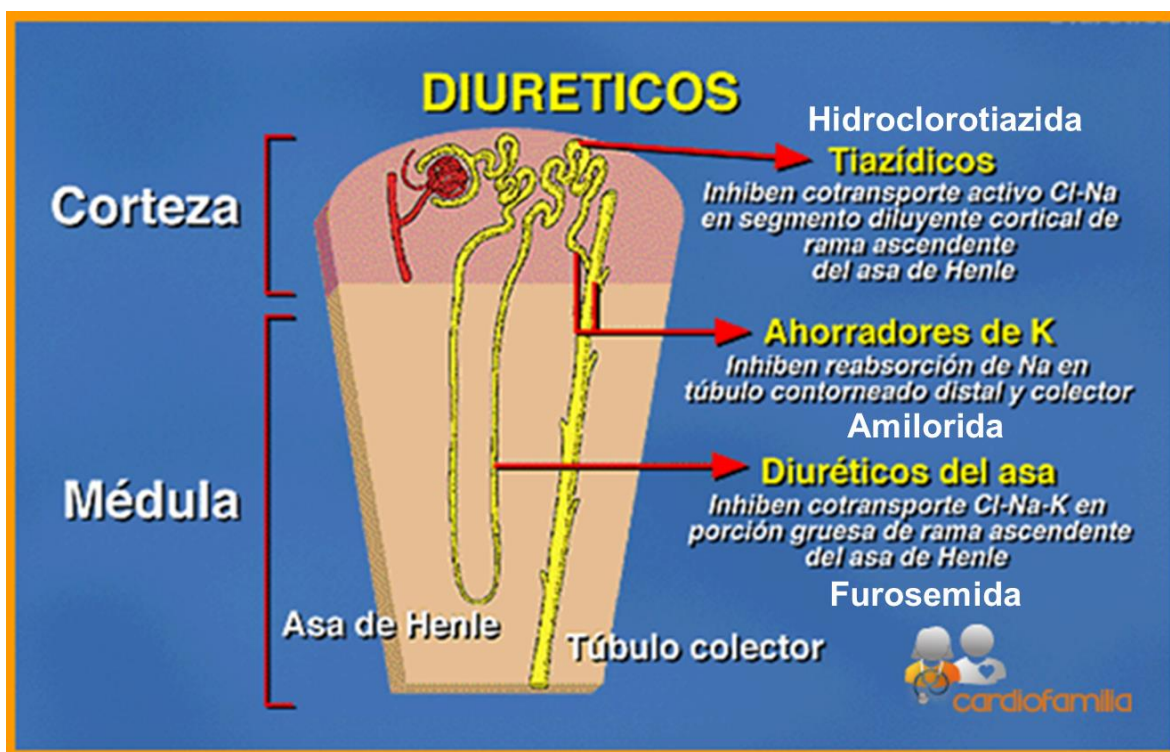


Figura 13.- Tipos de diuréticos, mecanismo de acción y sitio donde actúan [100].

- *Bloqueadores de canal de calcio*

Interfieren en el flujo de calcio por los canales lentos activos de la membrana celular:

- Células miocárdicas: depresión de la función miocárdica.
- Células del sistema de conducción: enlentecimiento de los impulsos eléctricos.
- Músculo liso vascular: reducción del tono vascular coronario y sistémico.

Son eficaces en la gran mayoría de pacientes, especialmente en ancianos y en la raza negra. De elección en la HTA sistólica aislada del anciano. Tienen pocas contraindicaciones, y suelen ser bien tolerados, sobre todo los preparados de acción prolongada. Se pueden asociar a casi todos los otros fármacos antihipertensivos (precaución en el uso conjunto de betabloqueantes y verapamilo o diltiazem), y no interfieren con los AINE. Su actividad no está influenciada por la ingesta de sodio (útil en pacientes con malos hábitos dietéticos [101,102]).

- *Vasodilatadores*

Es un grupo muy variado de fármacos cuyo efecto principal es originar una vasodilatación, que puede ser venosa, arterial o mixta. El mecanismo de acción por el cual cada uno de estos fármacos logra su acción es muy variable. Ejemplo:

a) Nitratos: en el interior de organismo liberan NO, esta molécula endógena provoca la relajación de la musculatura lisa vascular; además de sus acciones vasodilatadoras sistémicas, los nitratos producen vasodilatación coronaria. El efecto producido por este tipo de fármacos varía de acuerdo a la dosis [103].

- *Antagonistas del receptor AT1*

Los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARAI) se han desarrollado en el contexto de la búsqueda de nuevas formas de intervención sobre el SRA. El primer ARAII comercializado fue losartán, al que han seguido 5 principios activos más: irbesartán, valsartán, candesartán, telmisartán y eprosartán [104].

Los ARAII actúan impidiendo el efecto de la AII mediante el bloqueo específico y selectivo de los receptores AT1. La mayoría de los ARAII producen un bloqueo no competitivo o irreversible de modo que incluso con el aumento de los niveles de Ang II, el bloqueo no revierte. Sin embargo, a las dosis utilizadas en la práctica clínica estos fármacos se comportan como antagonistas competitivos reversibles, aunque muestran una disociación muy lenta del receptor [105].

- *Inhibidores de la ECA*

En 1970 se descubrió que en el veneno de la víbora “Bethrops Jaracaca” existía una sustancia con actividad hipotensora, en 1972 se aisló dicha sustancia denominada Teprotide y se demostró que su actividad hipotensora obedecía a su acción bloqueadora sobre la ECA. A partir de entonces se han realizado múltiples estudios los cuales han llevado al desarrollo de diversas sustancias inhibidoras de la ECA (IECA) que constituyen un valioso arsenal de fármacos hipotensores. Motiva la presente revisión el uso cada vez más frecuente de los IECA en el tratamiento de la hipertensión arterial. Los IECA han presentado un desarrollo impetuoso en los últimos años. En 1975 fue sintetizado el Captopril, en 1977 se publicó el primer reporte de este fármaco como un nuevo IECA sintético, y cuatro años más tarde el fármaco fue comercializado como prototipo de los IECA. Poco después fue comercializado el Enalapril y seguidamente, a finales de la década de 1980, el Lisinopril. En los años recientes se ha multiplicado la creación de estas sustancias [106].

Los IECA se encuentran actualmente entre los fármacos de primera elección en el tratamiento de la hipertensión arterial, debido a su gran eficacia y escasos efectos secundarios. Se clasifican según diferentes criterios:

1.- Según el orden de aparición en la práctica médica.

a) de primera generación: Captopril

b) de segunda generación: Enalapril

c) de tercera generación (reciente aparición): Lisinopril, Quinapril, Fosinopril, etc.

2.- Según la estructura química:

a) Con grupo carboxilo: Enalapril, Lisinopril, Ramipril, Quinipril y Benazepril.

b) Con grupo sulfidrilo: Captopril

c) Con grupo fosfodrilo: Fosinopril, Alacepril.

Las diferentes estructuras químicas presentan diferentes puntos de unión al zinc, puntos normalmente encontrados en la ECA. La unión a la enzima es altamente específica y con alto grado de afinidad, la especificidad y afinidad difieren entre las diferentes clases químicas, los

que tienen grupo carboxilo se unen más débilmente a la enzima que aquellos con grupo sulfidrilo, por tanto, el Captopril es más potente que el Enalapril como IECA en ausencia de otras variables, pero el gran número de sitios de unión de la molécula de Enalapril lo hace 5 veces más potente que el Captopril [107].

3.- Según la actividad del fármaco:

- a) El grupo de los profármacos (que requiere la transformación a su metabolito activo). Enalapril, Ramipril, Quinapril, Benazepril y Fosinopril.
- b) El grupo de los fármacos metabólicamente activos: Captopril y Lisinopril.

La formulación como profármacos se ha considerado que mejora la absorción y permite un inicio gradual de su acción debido a la necesidad de biotransformación a su forma activa.

4.- Según la farmacocinética:

- a) Los IECA de vida media corta: Captopril y Quinapril.
- b) Los IECA de vida media larga: Enalapril y Lisinopril.

La eliminación de los IECA ocurre principalmente por el riñón, por lo que la dosis debe reajustarse en pacientes con deterioro de la función renal. La excepción de lo anterior es el Fosinopril que se elimina el 50% por la bilis y el restante 50% por el riñón lo que permite usarse sin reajuste de dosis [108].

Los IECA interfieren en la producción de Ang II por inhibición de la enzima de conversión de forma competitiva. Como consecuencia del bloqueo de la ECA se produce inicialmente una disminución de Ang II. La inhibición de esta vía podría ser responsable de posibles efectos beneficiosos añadidos de los IECA al favorecer la producción de óxido nítrico y prostaglandinas vasodilatadoras, pero contribuye casi con certeza a producir determinados efectos adversos como la tos y el angioedema [104].

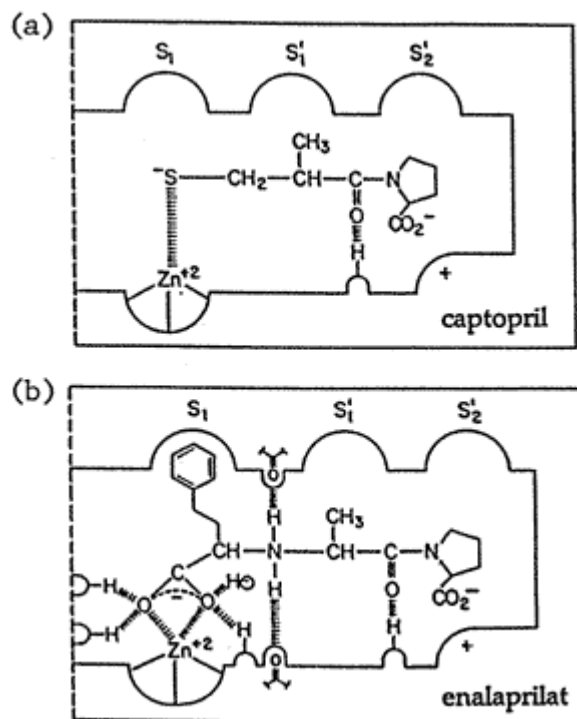


Figura 14.- Representación del mecanismo de acción del Captopril y el Enalapril sobre la ECA [108].

La selección de una específica droga o la combinación de drogas o el evitar alguna de ellas, debe considerar lo siguiente:

- a) la previa favorable o desfavorable experiencia del paciente con una determinada clase de compuesto;
- b) el efecto de la droga en los factores de riesgo del paciente;
- c) la presencia de daño orgánico subclínico, enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria, renal o diabetes, alteraciones que pueden ser tratadas más favorablemente con unas drogas que con otras;
- d) las posibilidades de interacciones con drogas en uso por el paciente para otras condiciones clínicas;
- e) el costo de las drogas, aspecto que no debe primar sobre la eficacia, tolerabilidad, y protección del paciente individual;
- f) continua atención merece la observación de los efectos colaterales de las drogas, porque ellos son la principal causa de no adherencia;
- g) el efecto reductor de la presión arterial debe durar 24 horas pudiendo controlarse satisfactoriamente con el monitoreo ambulatorio, siendo el método del auto control en casa el más práctico;
- h) las drogas con efecto de 24 horas deben ser preferidas porque su programación favorece la adherencia del paciente [73].

- *Recomendación de acuerdo a la NOM para el tratamiento de la HTA.*

Se recomienda como orden de preferencia en la selección de antihipertensivos, el siguiente: Inhibidores de ECA, dosis bajas de tiazidas, beta-bloqueadores y calcio antagonistas. El tratamiento farmacológico en pacientes con hipertensión arterial sistólica (TA sistólica ≥ 160 mmHg TA diastólica < 90 mmHg) debe ser igual que en pacientes con hipertensión arterial sistólica y diastólica. Debe iniciarse tratamiento farmacológico inmediato en pacientes con presión arterial persistente con cifras $\geq 160/100$ mmHg, así como en pacientes con presión arterial $\geq 140/90$ con elevado riesgo cardiovascular (riesgo $> 20\%$ a 10 años) o con daño a órgano blanco.

En pacientes menores de 55 años de edad el tratamiento de elección debe ser un Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

En pacientes hipertensos ≥ 55 años debe iniciarse el tratamiento farmacológico con un diurético tiazida o un calcio antagonista.

Los pacientes mayores de 80 años deben recibir el mismo tratamiento farmacológico que los pacientes mayores de 55 años, considerando siempre la presencia de comorbilidad y polifarmacia.

En pacientes portadores de angina o infarto al miocardio e hipertensión arterial se recomienda tratamiento con beta bloqueadores y calcio antagonistas. En pacientes con hipertensión arterial e insuficiencia renal, en ausencia de estenosis de la arteria renal, el tratamiento de elección es con Inhibidores de ECA o Bloqueadores de Angiotensina II en los pacientes alérgicos.

En pacientes con hipertensión arterial y diabetes mellitus, se obtiene una mayor reducción en el riesgo de eventos cardiovasculares con cifras tensionales $< 130/80$ mmHg.

En pacientes hipertensos con otras condiciones de alto riesgo (uso de anticoagulantes orales, enfermedad vascular cerebral hemorrágica reciente, riñón único, alteraciones de la coagulación, aneurismas, etc.) el control de la presión arterial debe ser estricto $\leq 130/80$. En pacientes hipertensos con otras condiciones de alto riesgo (uso de anticoagulantes orales, enfermedad vascular cerebral hemorrágica reciente, riñón único, alteraciones de la coagulación, aneurismas, etc.) el control de la presión arterial debe ser estricto 130/80 [77].

2.4 Desarrollo de nuevos fármacos

Desde la antigüedad los principios activos disponibles para el tratamiento de enfermedades se encontraban en preparaciones principalmente de plantas y en menor proporción de animales o minerales. Más adelante, gracias al desarrollo de la experimentación fisiológica, y de la química medicinal en países Europeos, el aislamiento, purificación e identificación de componentes activos de viejas preparaciones, así como la síntesis de nuevos fármacos, se hizo posible. El avance de la farmacología, favorecido por el desarrollo de métodos de experimentación, no sólo permitió distinguir los principios activos de preparaciones que contenían mezclas complejas de sustancias, sino también permitió determinar cómo éstos producen sus efectos en los organismos vivos. Por otro lado, la intensa investigación desarrollada dentro de la industria farmacéutica, originó la proliferación de medicamentos nuevos. Un mayor número de enfermedades se beneficiaron con la introducción de estos productos. Sin embargo, muchos de ellos carecían de investigación clínica sistematizada, y la aparición de efectos adversos severos, como la focomelia producida por la talidomida en 1962, obligó a los gobiernos a emitir normas y reglamentos que protegieran al ser humano de los efectos tóxicos propios de todo fármaco. Esto permitió la creación de Comités de Ética y de Investigación que vigilara el desarrollo de la investigación clínica en humanos [109].

Antes de que un posible principio activo pueda ser probado en seres humanos, es necesario realizar ensayos preclínicos. Aquí se prueba la toxicidad de la sustancia o su posible daño al cuerpo humano. Estas pruebas a veces se llevan a cabo en cultivos celulares (*in vitro*), y otras, sin embargo, es indispensable que las pruebas se realicen en el organismo (*in vivo*).

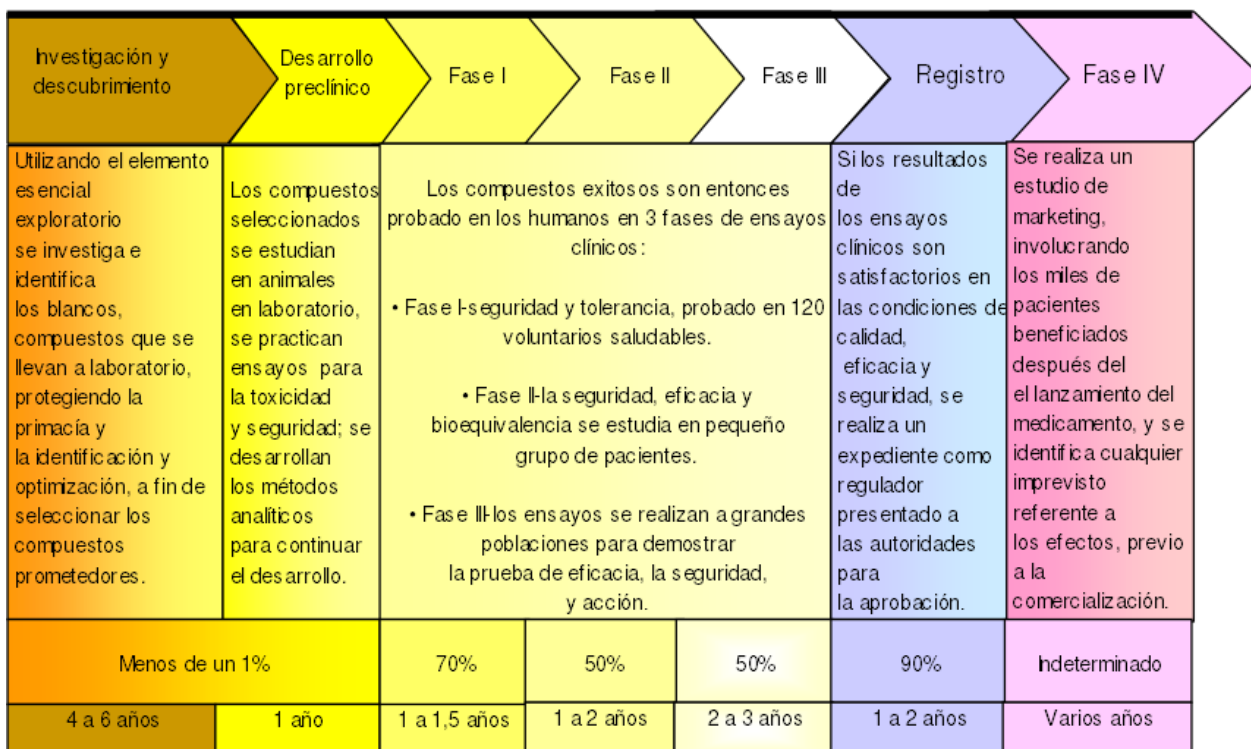


Figura 15.- Fases del desarrollo de un nuevo fármaco [110].

2.4.1 Familia de Compuestos LQM300

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la HTA presentan una serie de efectos secundarios, esto ha motivado que diversos grupos de investigación se encuentren trabajando en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos con actividad antihipertensiva pretendiendo que sean más efectivos y con un menor número de efectos colaterales.

En 1979 un grupo de investigadores chinos mientras examinaban propiedades contra la malaria de derivados de la Febrifugina (fármaco alcaloide coccidiostático, aislado de la planta *Dichroa febrífuga*), notaron que un compuesto, la Changrolina (Figura 15) era efectivo como agente antiarrítmico [4].

Por otra parte, Stout y su equipo de investigación introdujeron una nueva serie de compuestos antiarrítmicos realizando algunas variaciones en la estructura de la changrolina, encontraron primero que la changrolina puede ser conceptualmente dividida en tres regiones:

- 1) Región heteroatómica que contiene la quinazolina.
- 2) Región Aromática con el bis(pirrolidinilmetil) fenol.
- 3) Región enlazante entre las dos primeras regiones.

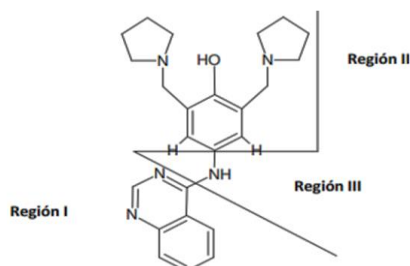


Figura 16.- Estructura química de la Changrolina [3].

Posteriormente encontraron las regiones responsables de la actividad biológica, mostrando que la región 2 el bis(pirrolidinilmetil) fenol era importante para mostrar una buena actividad antiarrítmica además que en la región 1, la quinazolina podía ser reemplazada por una variedad de anillos heteroatómicos sin que disminuya su actividad, y que la región que une las dos primeras regiones tiene una mayor actividad y una menor toxicidad cuando contenía un grupo carbonilo [3].

Para la síntesis de la Familia LQM300 los investigadores utilizaron dispositivos computacionales como la supercomputadora Kan Balam de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), asimismo recurrieron a plataformas Unix, Mac y Linux, para elaborar los estudios in silico, donde se realizaron distintas pruebas de *Docking* utilizando los siguientes programas: *Modelador de Interface*, *What if check*, *Fast ms Channel* y *Sybil Docking*.

Además mediante técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de Masas, las cuales permitieron determinar la estructura química de los compuestos sintetizados [5].

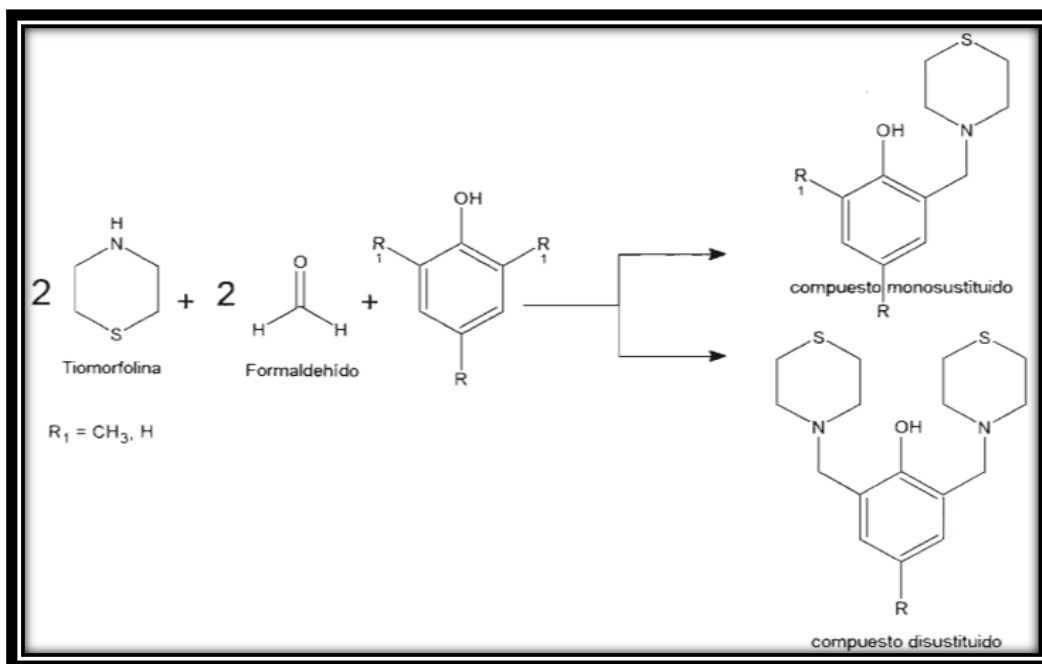


Figura 17.- Diagrama General de la Síntesis de Compuestos Tiomorfolínicos [3].

2.4.1.1 4-terbutil-Bis-(2, 6-tiomorpholi-4-il-metil)-1-fenol

También conocido como LQM319, es un compuesto ditiomorfolínico, con baja solubilidad en agua y con propiedades antihipertensivas.

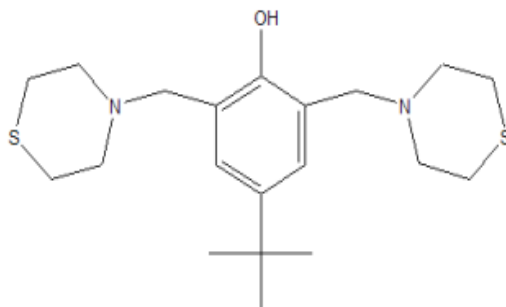


Figura 18.- Estructura química del compuesto LQM319 [3].

Por otro lado el LQM319 genera un mejor decremento de presión sistólica y diastólica, tiene mayor efecto vasodilatador que el propanolol, posee menor genotoxicidad que el captopril y una dosis letal menor [4, 111, 112].

3. HIPÓTESIS

El compuesto [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] disminuirá la expresión del *ARNm* de la enzima convertidora de angiotensina en aorta y ventrículo de ratas macho espontáneamente hipertensas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del compuesto [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] y captopril sobre la expresión de la ECA y ECA2 en aorta y músculo cardiaco mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para determinar si la expresión del *ARNm* de ambas enzimas se modifica por el tratamiento en la rata SHR.

4.1 Objetivos Específicos

- Implementar la técnica de extracción de ARN de muestras de tejidos (ventrículo y aorta) de SHR por el método del Trizol, para su uso en la RT-PCR de punto final.
- Estandarizar la técnica de RT-PCR de punto final para la amplificación de un fragmento del *ARNm* de ECA y ECA2 en aorta y ventrículo de rata espontáneamente hipertensa.
- Comparar los efectos obtenidos sobre las síntesis de ECA y ECA2 en SHR, tratadas con Captopril y LQM319, utilizando la técnica de RT-PCR de punto final.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material

Reactivos biológicos

15 Ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR) y 5 Ratas Wistar, ambos grupos compuestos por machos de 6 meses de edad con un peso de 250-300g. La hipertensión de las SHR se corrobora con la toma de presión por duplicado durante 3 días.

Soluciones y reactivos

TBE 1X	Isopropanol- SIGMA
Solución salina fisiológica	Cloroformo- SIGMA
Solución RNA Secure®	Etanol 70 %- SIGMA
TRIzol- SIGMA	Ácido clorhídrico (0.1 N)
Agarosa- SIGMA	Agua Milli-Q®
Oligos sentido y antisentido para GAPDH, ECA1 y ECA2 (Invitrogen™)	

Material de laboratorio y consumibles

Micropipetas Eppendorf® de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL
Gradillas
Jeringas de insulina de 1 mL
Puntas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL
Tubos Eppendorf de 1.5 mL con tapa adherida y con tapa de rosca
Microtubos de 200 µL
Hielo seco y húmedo
Sanitas o servitoallas

Kit AccessQuick™ RT-PCR System

H₂O tratada con DEPC

AMV/Tfl 5X Buffer

Mg SO₄

dNTP's Mix

AMV RT

Tfl DNA polimerasa

Equipos

Termociclador (Eppendorf -Mastercycler® Gradient)

Espectrofotómetro (Nanodrop 2000® UV-Visible)

EpiChemi3 Darkroom® UVP BioImaging Station

Balanza analítica (Sartorius™)

Balanza granataria para animales

Balanza de Precisión

Cámara de electroforesis

Fuente de poder EC-105

Software

Labworks Image Acquisition and Analysis®

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®)

Graph Pad Prism 5®

5.2 Preparación de soluciones

- TBE 5X

Se pesan 54 g de base TRIS, 27.5 g de ácido bórico disolviendo ambos en 800 mL de agua Milli-Q. Añadir 20 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y ajustar la solución a un volumen final de 1 L.

5.3 Metodología para estandarización de la técnica RT-PCR para GAPDH, ECA y ECA2 en ventrículo y aorta de rata espontáneamente hipertensa

5.3.1 Selección de Primers

1.- Los oligos seleccionados para este protocolo se obtuvieron del artículo:

Li, N., Zimpelmann, J., Cheng, K., Wilkins, J. y Burns, K. (2004). The Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 in the generation of Angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 288, 353-362. doi: 10.1152/ajprenal.00144.2004

Oligo	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Producto
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	207bp
ECA	GCCACATCCAGTATTTTCATGCAGT	AACTGGAAGTGGATGATGAAGCTGA	442bp
ECA2	GGAGAATGCCCAAAGATGA	GGTCCAATCCTGGTTCAAGT	281bp

Tabla 3.- Secuencia y tamaño de producto de los primers de GAPDH, ECA y ECA2 [132].

2.- Se realizó análisis *in silico* de los oligos mediante el software Primer BLAST® por corroborar su afinidad.

GAPDH:

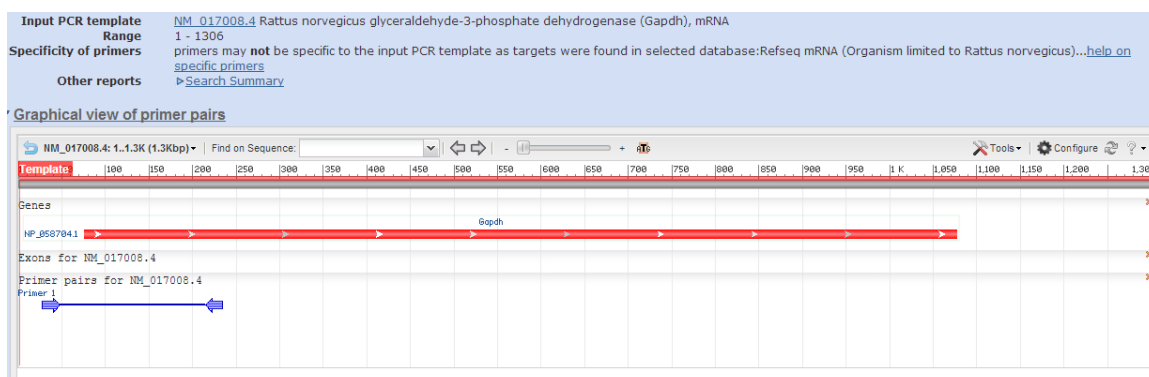


Figura 19.- Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de GAPDH [133].

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGACAGCCGCATCTTCTGT	Plus	20	28	47	59.68	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	CTTGCCGTGGTAGAGTCAT	Minus	20	234	215	59.46	55.00	3.00	2.00
Product length	207								

Products on intended target

>NM_017008.4 Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA

product length = 207

Forward primer 1 AGACAGCCGCATCTTCTGT 20
 Template 28 47

Reverse primer 1 CTTGCCGTGGTAGAGTCAT 20
 Template 234 215

Figura 20.- Especificaciones de primers para GAPDH [133].

ECA:

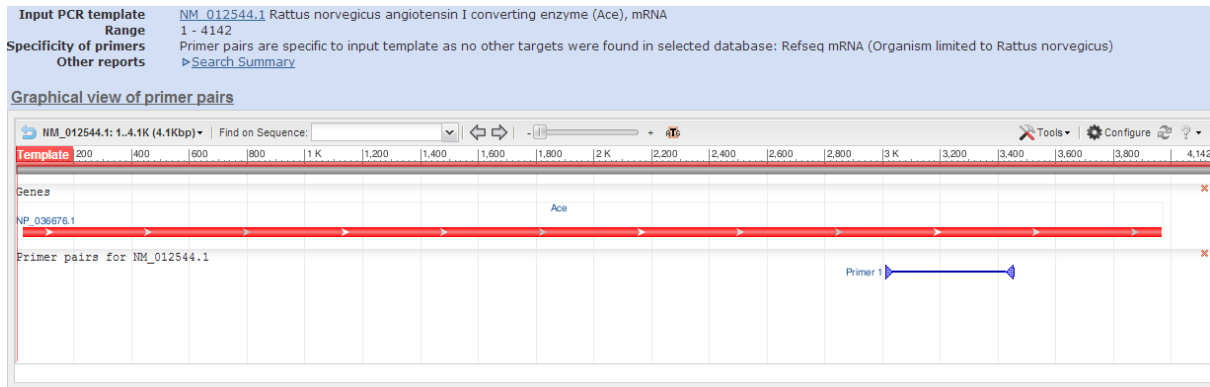


Figura 21.- Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA [133].

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCACATCCAGTATTTTCATGCAGT	Plus	24	3013	3036	61.70	45.83	4.00	4.00
Reverse primer	AACTGGAAC TGGATGATGAAGCTGA	Minus	25	3454	3430	62.27	44.00	4.00	1.00
Product length	442								

Products on intended target

>NM_012544.1 Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme (Ace), mRNA

product length = 442

Forward primer 1 GCCACATCCAGTATTTTCATGCAGT 24
 Template 3013 3036

Reverse primer 1 AACTGGAAC TGGATGATGAAGCTGA 25
 Template 3454 3430

Figura 22.- Especificaciones de primers para ECA [133].

ECA2:

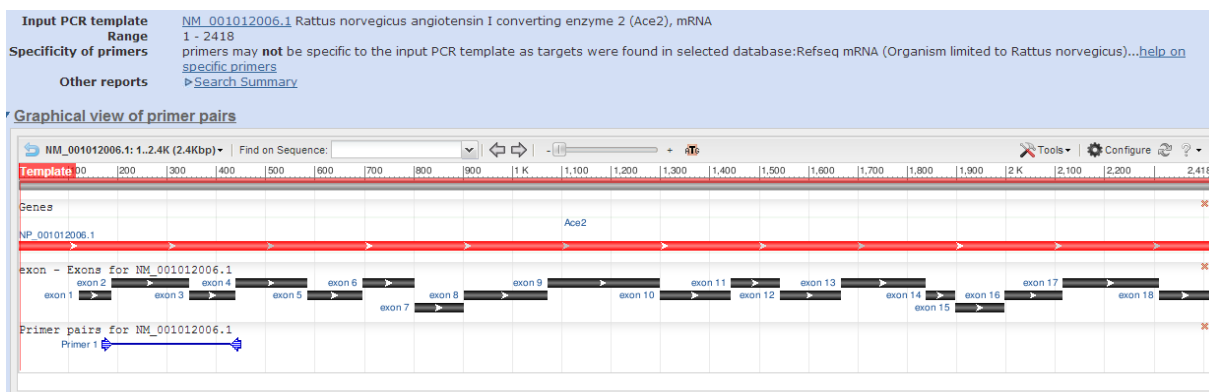


Figura 23.- Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA2 [133].

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAGAATGCCCAAAGATGA	Plus	20	168	187	55.69	45.00	2.00	1.00
Reverse primer	CGTCCAATCCTGGTTCAAGT	Minus	20	448	429	57.81	50.00	3.00	1.00
Product length	281								

Products on intended target

>NM_001012006.1 Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme 2 (Ace2), mRNA

product length = 281

Forward primer 1 GGAGAATGCCCAAAGATGA 20
Template 168 187

Reverse primer 1 CGTCCAATCCTGGTTCAAGT 20
Template 448 429

Figura 24.- Especificaciones de primers para ECA2 [133].

5.3.2 Obtención del tejido

1. Las ratas utilizadas para este proyecto fueron sacrificadas utilizando cámara de CO₂.
2. Posterior a la eutanasia, el cadáver se colocó sobre una superficie previamente esterilizada con Etanol al 70 %.
3. Utilizando tijeras y pinzas se abrió la caja torácica, retirando las costillas para facilitar la extracción de los tejidos.
4. El ventrículo izquierdo del corazón se extrajo utilizando pinzas y tijeras esterilizadas; el tejido se colocó en un tubo Eppendorf el cual fue depositado en hielo seco para evitar su degradación.
5. Se repitió el mismo proceso para la extracción de Aorta.

6. Los cadáveres se colocaron en bolsas amarillas y se depositaron en un congelador para su posterior incineración.

5.3.3 Extracción de ARN. [131]

1. El tejido fue homogenizado vigorosamente con 1 mL de TRI-Reagent por 5 minutos a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf. Se resuspendió el lisado utilizando una punta de pipeta. (No utilizar Vortex en este paso)*

2. Se añadieron 200 μ L de cloroformo al tubo con homogenizado y se mezcló utilizando Vortex por 15 segundos, se permitió la separación de las fases durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

3. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo estéril con tapa de rosca y se añadió 3 μ L de glicógeno. Se mezcló por Vortex durante pocos segundos.

4. Se añadieron 500 μ L de isopropanol, se mezcló y dejó precipitar por 10 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarlo a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.*

5. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla restante con etanol 70 %/Agua tratada con DEPC y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos a 4 °C.*

6. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla al ambiente de 5-10 minutos y se disolvió en 10 μ L de solución RNA Secure por incubación a 60 °C por 10 minutos.*

7. La cuantificación se realizó por medición de la densidad óptica de 2 μ L de la muestra a 260 nm, mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop, y se logró calcular la concentración de RNA.

*Al terminar el paso se puede detener el proceso congelando la muestra a – 80 °C.

5.3.4 Retrotranscripción

Para este paso se utilizó el Kit Access RT-PCR System de Promega, que permite realizar tanto la retro transcripción como la PCR en el mismo tubo.

1. En un tubo Eppendorf de 200 μL se colocaran los reactivos en las siguientes proporciones:

Reactivo	Volumen
H ₂ O tratada con DEPC	32 μL
AMV/ <i>Tfl</i> 5X Buffer	10 μL
Mg SO ₄	2 μL
dNTP's Mix	1 μL
*Primer (Forward) [5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	1 μL
*Primer (Reverse) [5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	1 μL
AMV RT	1 μL
<i>Tfl</i> DNA Polimerasa	1 μL
RNA [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	1 μL
Total	50 μL

Tabla 4.- Reactivos y cantidades a utilizar en la RT-PCR.*Dependiendo del gen a evaluar en cada RT-PCR se utilizaron los primers anteriormente seleccionados para GAPDH, ECA1 y ECA2 (5.3.1).

2. Se homogenizó la muestra y centrifugó algunos segundos.

3. Se colocó en el Termociclador *Eppendor Mastercycler Gradient* bajo las siguientes condiciones.

Número de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	45 °C	45 min
1	94 °C	2 min
1	95 °C	1 min

Tabla 5.- Condiciones a utilizar en el termociclador para la retrotranscripción.

4. Al finalizar la RT, el tubo puede congelarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para utilizarse posteriormente.

5.3.5 PCR

1.- Para conocer las condiciones correctas para la expresión de los genes de GAPDH, ECA y ECA2 en cada PCR, se realizó lo siguiente:

A) Gradientes de expresión de GAPDH, ECA y ECA2

1.- Para ello se realizaron 5 PCR, con distinto número de ciclos, para cada gen, de acuerdo a las siguientes condiciones:

Número de Ciclos	Temperatura	Tiempo
*	95 °C	30 s
	55 °C	30 s
	74 °C	45 s
1	72 °C	10 min

Tabla 6.- Condiciones de PCR para los gradientes de expresión.

<i>Gen</i>	<i>*No. De Ciclos para Gradiente</i>
GAPDH	20,25,30,35 y 40
ECA	30-,35, 40 y 45
ECA2	35, 40, 45, 50 y 55

Tabla 7.- Número de ciclos para cada una de las PCR de cada gen.

B) Alineamiento de Primers para ECA

En el caso de ECA se realizó un gradiente de alineamiento de los primers con la finalidad de identificar la temperatura óptima a la que los primers se alinean con el cADN, ya que a la temperatura de 60 °C reportada en el artículo [32] no se observaba el producto de PCR.

<i>Pozo 1</i>	<i>Pozo 2</i>	<i>Pozo 3</i>	<i>Pozo 4</i>	<i>Pozo 5</i>
53 °C	55 °C	57 °C	59 °C	62 °C

Tabla 8.- Temperatura de cada pozo de PCR para alineamiento de primers de ECA.

5.3.6 Electroforesis en gel de agarosa al 2%

1. Se preparó el gel utilizando 1 gramo de agarosa por cada 50 mL de TBE 1X y calentado la mezcla en microondas con agitación constante hasta homogenizar la mezcla, evitando la formación de burbujas.
2. Posteriormente se vertió lentamente la preparación en el recipiente diseñado para geles, que posee la cámara, con los peines previamente colocados.
3. Se dejó polimerizar la agarosa en el recipiente, sobre una superficie plana hasta gelificar completamente.
4. Se extrajeron los peines del recipiente y se colocó en la cámara de electroforesis.
5. La cámara se llenó con buffer TBE 1X hasta cubrir el gel.
6. En los pozos se colocaron las muestras*, previamente mezcladas con el buffer de carga 6X, dejando solo el primer pozo para el marcador de peso molecular de 100 bp.
7. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje (60-80 V) y se corrieron las muestras.
8. Al finalizar la corrida el gel se introdujo en un recipiente con Solución de bromuro de etidio y posteriormente se observó en el transiluminador (UV).
- 9.- Para la obtención de fotos de los geles se utilizó el software Labworks Image Acquisition and Analysis®, con el que fue posible visualizar las bandas y determinar su densidad óptica.

*En el caso de ARN se cargaron 2 µg de muestra en cada pozo con el buffer de carga 6X, de forma semejante a los productos de PCR.

5.4 Metodología para la experimentación

Se aplicaron las técnicas previamente estandarizadas de obtención de tejido, extracción de ARN, RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa; para los grupos Testigo (5 Ratas Wistar), Control (5 SHR), Captopril (5 SHR Tratadas con Captopril) y LQM319 (5 SHR Tratadas con el compuesto LQM319).

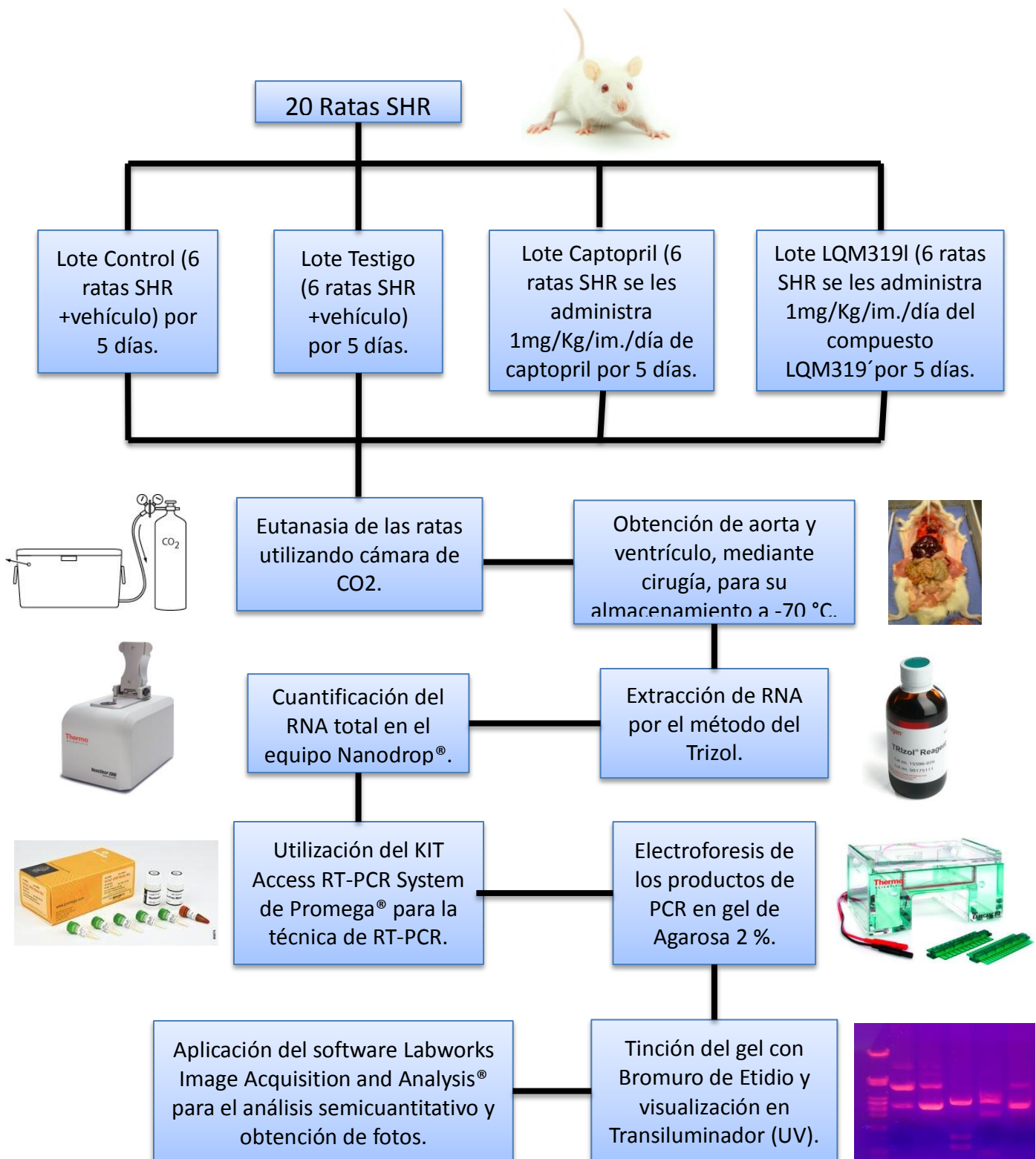
<i>Gen</i>	<i>No. de ciclos de PCR para cada gen</i>
GAPDH	25
ECA	43
ECA2	43

Tabla 9.- Número de ciclos fijado para la PCR de cada gen

5.4.1 Análisis Estadístico

1.- Para ello se tomaron diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$ mediante la prueba de Tukey y la de ANOVA. Los softwares utilizados para la elaboración de las gráficas y la estadística fueron Excel 2007 y Graph Pad Prism 5.

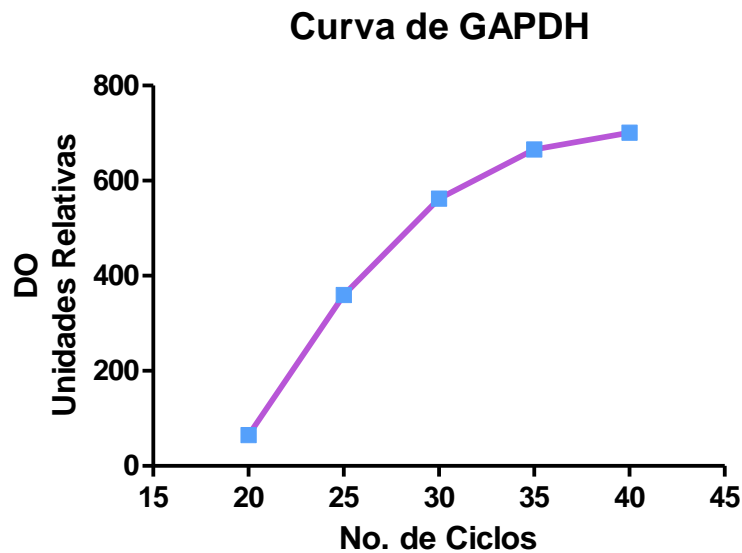
5.5 Diseño experimental



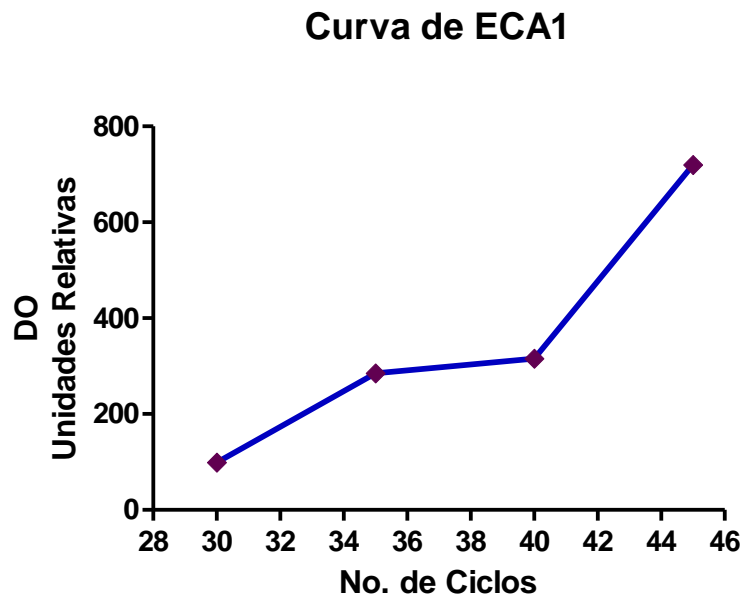
6. RESULTADOS

6.1 Resultados de la estandarización de la técnica

A continuación se presentan los gráficos de expresión, obtenidos durante la estandarización, de acuerdo al número de ciclos de PCR.

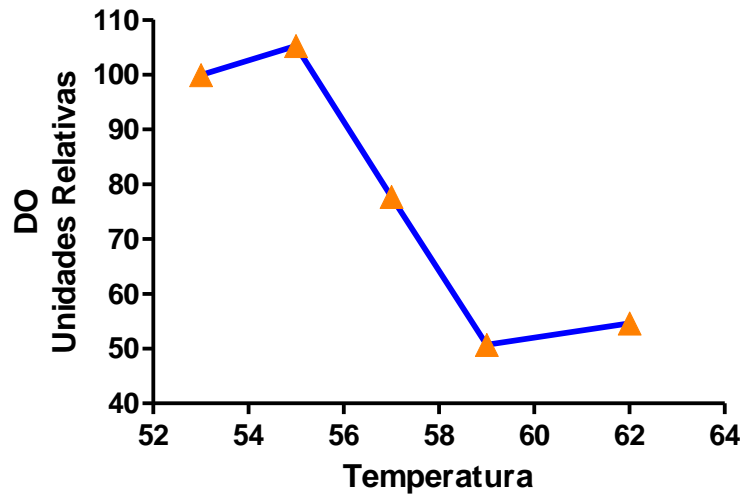


Gráfica 1.- Gradiente de expresión del gen de mantenimiento GAPDH de acuerdo al número de ciclos. La curva comenzó a los 20 ciclos y concluyó a los 40, manteniendo un intervalo de 5 ciclos entre los 5 puntos. La curva nos muestra un punto de linealidad entre los 25 y 30 ciclos.



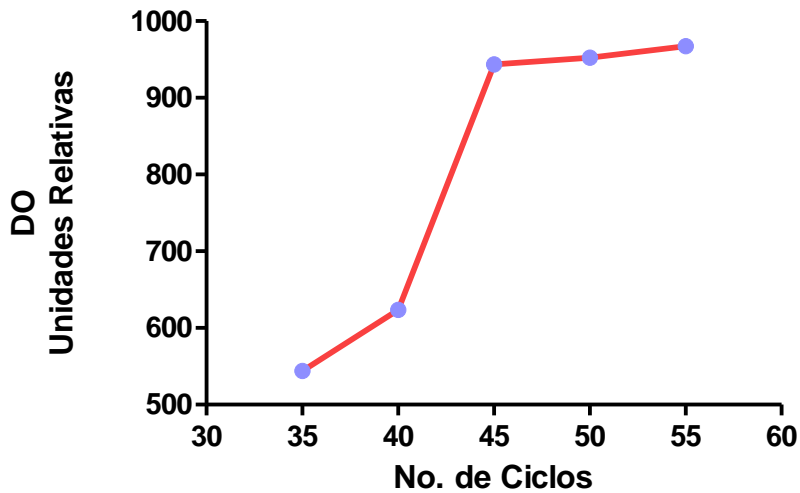
Gráfica 2.- Curva de expresión del gen ECA de acuerdo al número de ciclos. El gradiente comenzó a los 30 ciclos y terminó a los 45, manteniendo un intervalo de 5 ciclos entre los 4 puntos. La curva muestra linealidad entre los 40 y 45 ciclos.

Curva de Primers de ECA1



Gráfica 3.- Gradiente de temperatura para el alineamiento de los primers de ECA, con un intervalo de 2-3 grados entre los puntos. Es posible visualizar que a 55 °C fue mayor la expresión de la ECA.

Curva de ECA2



Gráfica 4.- Curva de expresión del gen ECA2 de acuerdo al número de ciclos. El gradiente inicia a los 35 ciclos y terminó a los 55, manteniendo un intervalo de 5 ciclos entre los 4 puntos. La curva muestra linealidad entre los 40 y 45 ciclos.

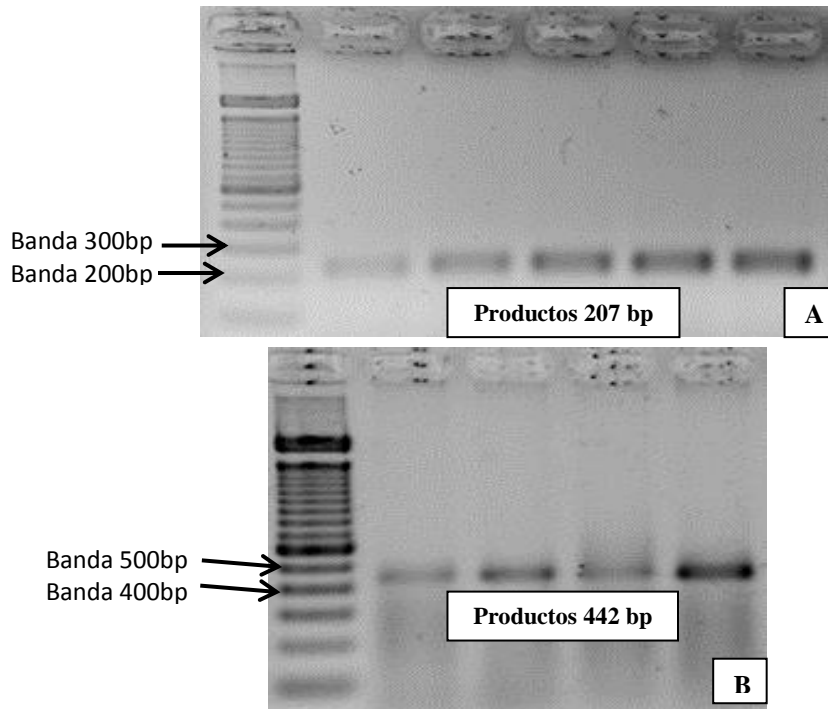


Figura 25.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Gradiente de GAPDH de 20-40 ciclos, el tamaño del producto es de 207bp. B. Gradiente de ECA de 30-45 ciclos, el producto es de 442bp.

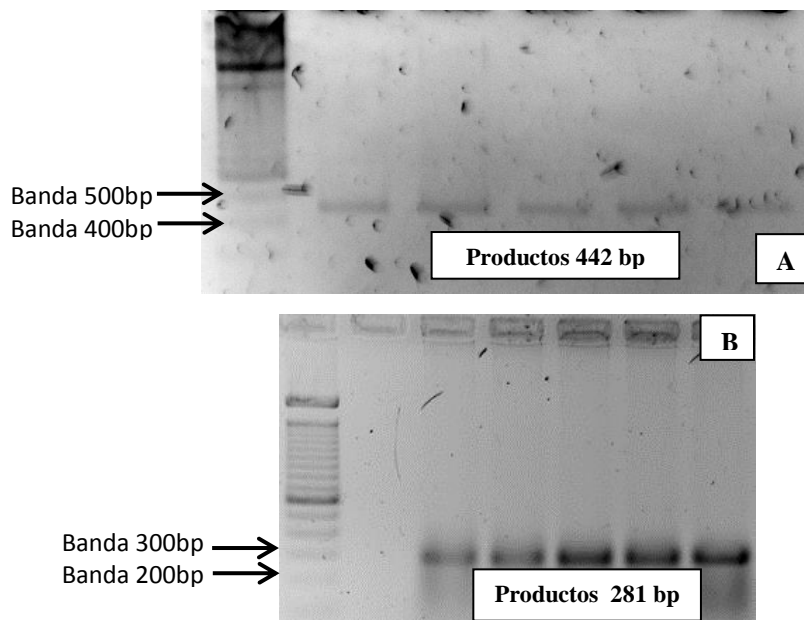
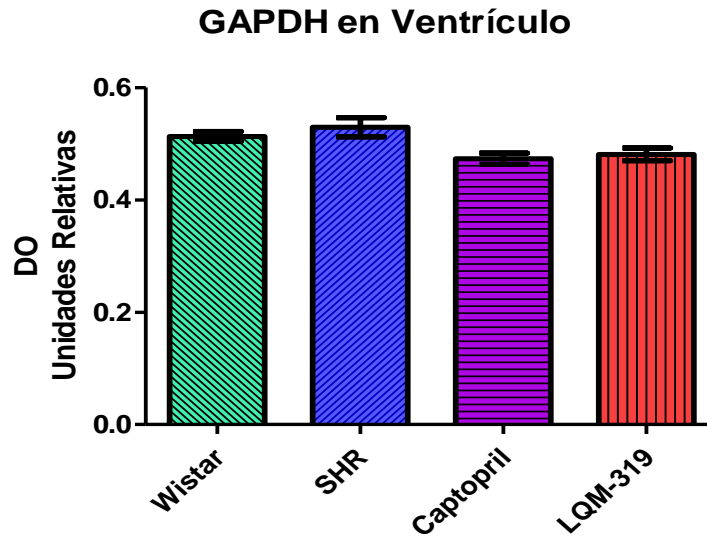


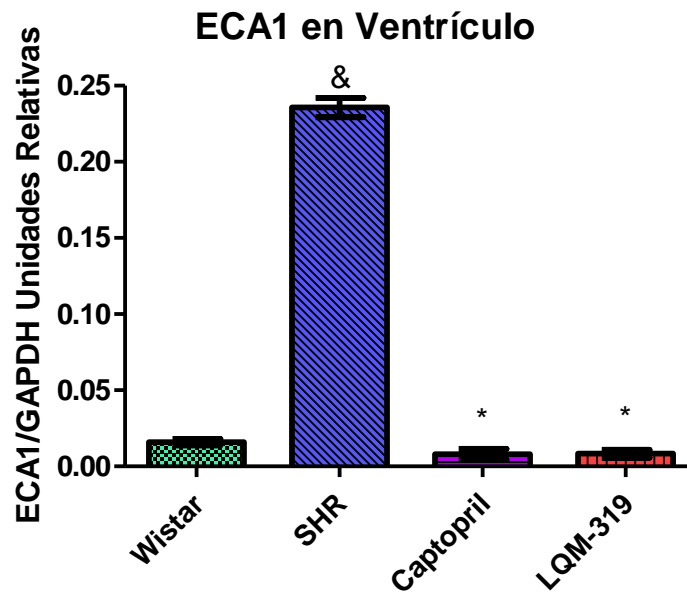
Figura 26.- A. Alineamiento de primers de ECA. B. Gradiente de ECA2 va de 35-55 Ciclos, con un producto de 281bp.

6.2 Resultados de la experimentación

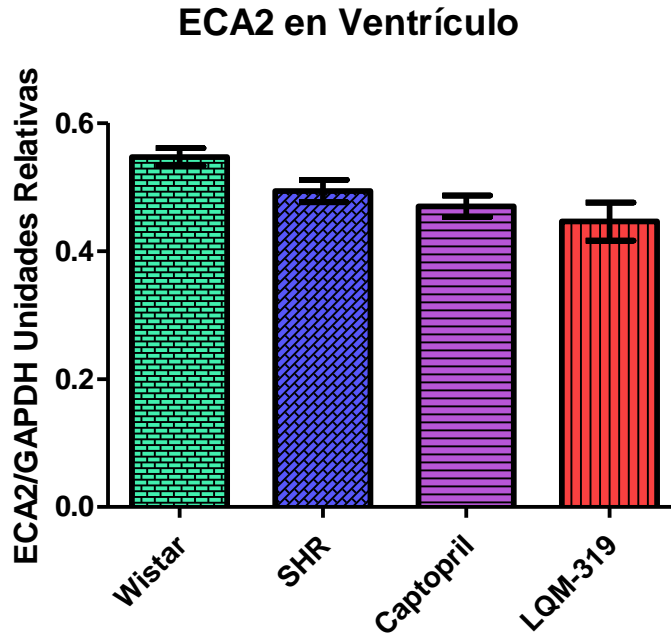
En los siguientes resultados se muestra la expresión de los genes de interés y el efecto que generan los tratamientos.



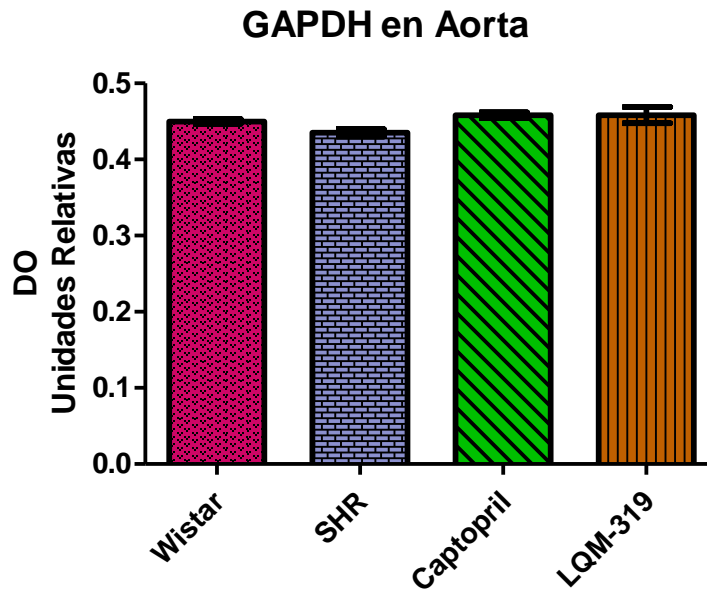
Gráfica 5.- Expresión de GAPDH en Ventrículo de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319. Valores del promedio \pm SEM. &P<0.05 vs Wistar. *P<0.05 vs SHR.



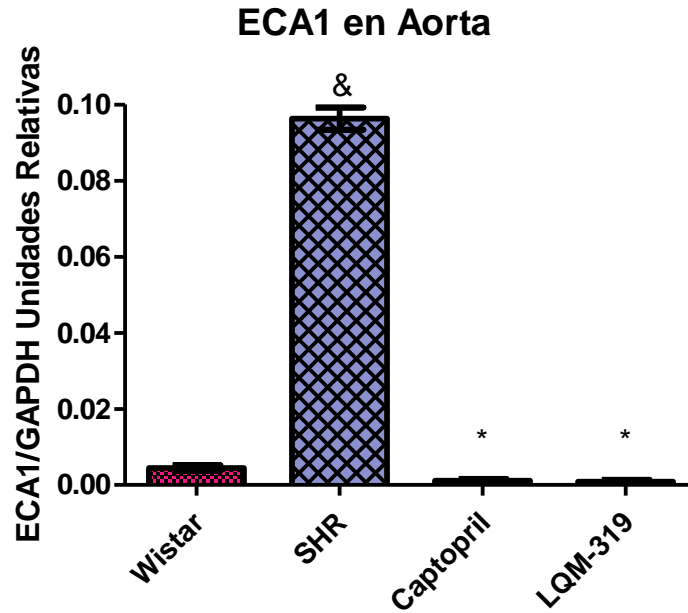
Gráfica 6.- Expresión de ECA en Ventrículo de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319. Valores del promedio \pm SEM. &P<0.05 vs Wistar. *P<0.05 vs SHR.



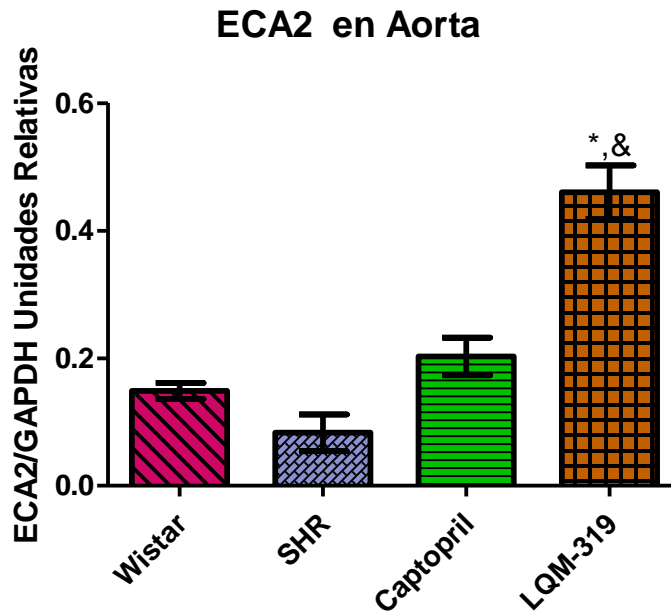
Gráfica 7.- Expresión de ECA2 en Ventrículo de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319. Valores del promedio \pm SEM. &P<0.05 vs Wistar. *P<0.05 vs SHR.



Gráfica 8.- Expresión de GAPDH en Aorta de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319. Valores del promedio \pm SEM. &P<0.05 vs Wistar. *P<0.05 vs SHR.



Gráfica 9.- Expresión de ECA en Aorta de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319. Valores del promedio ± SEM. &P<0.05 vs Wistar. *P<0.05 vs SHR.



Gráfica 8.- Expresión de ECA2 en Aorta de grupo Testigo (Wistar), grupo Control (SHR), tratado con Captopril y tratado con LQM-319. Valores del promedio ± SEM. &P<0.05 vs Wistar. *P<0.05 vs SHR.

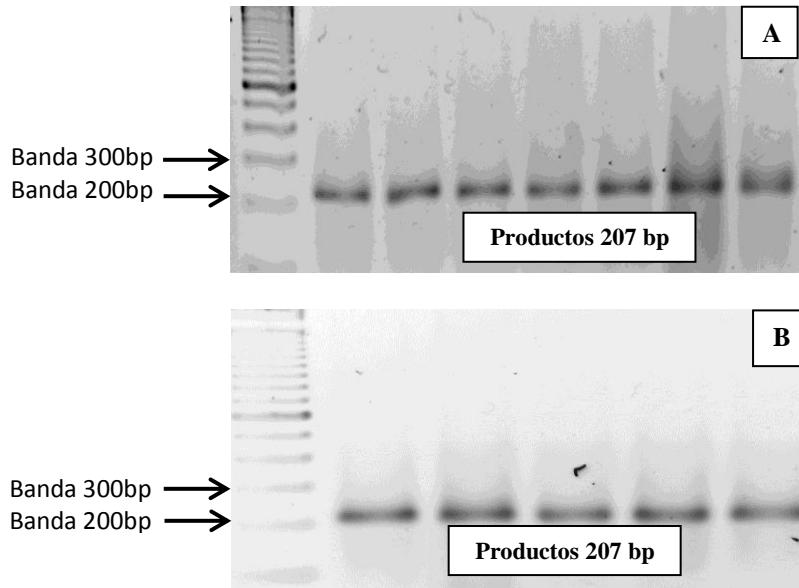


Figura 27.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Expresión de GAPDH en Ventrículo, grupo tratado con Captopril. B. Expresión de GAPDH en Ventrículo, grupo tratado con LQM-319.

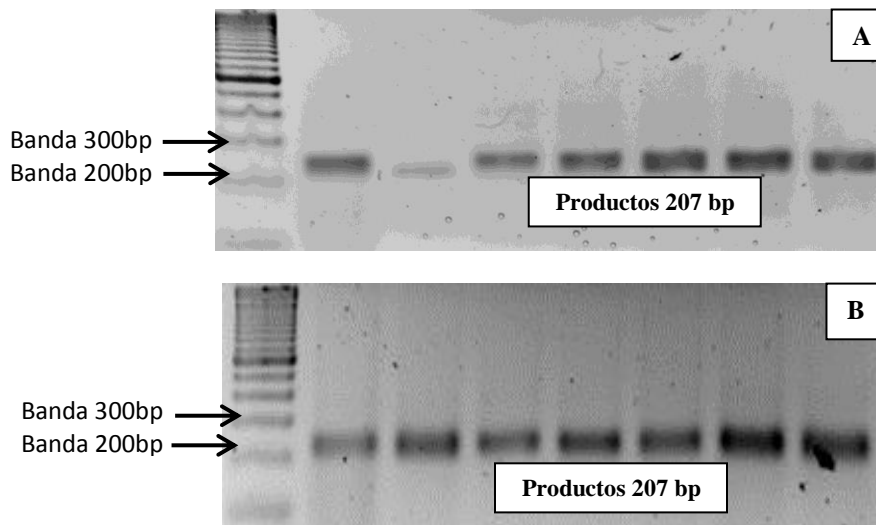


Figura 28.- A. Expresión de GAPDH en Aorta, grupo tratado con Captopril. B. Expresión de GAPDH en Aorta, grupo tratado con LQM-319.

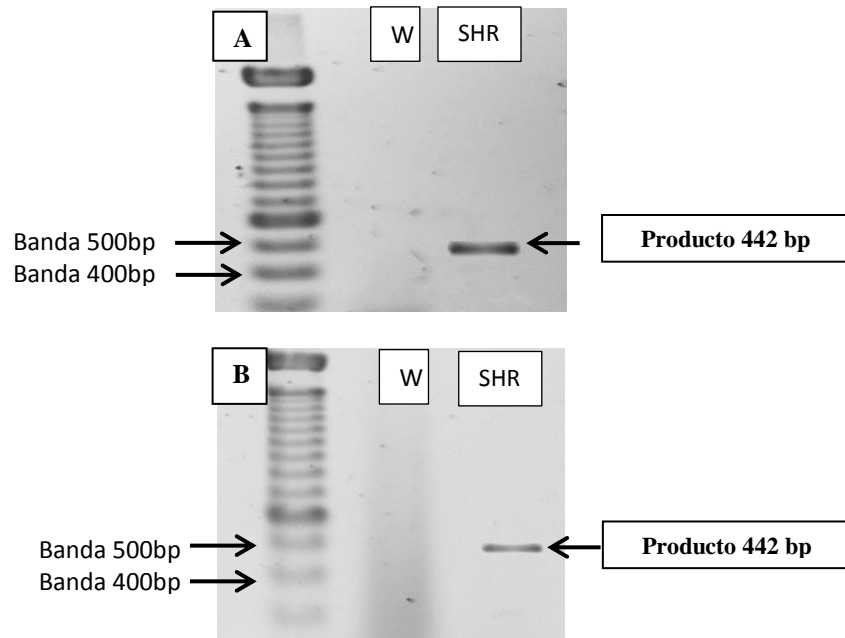


Figura 29.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Expresión de ECA en Ventrículo, grupo tratado con Captopril y LQM-319. B. Expresión de ECA en Aorta, grupo tratado con Captopril y LQM-319. *W= Rata Wistar (Testigo) y SHR= Rata Espontáneamente Hipertensa (Control).

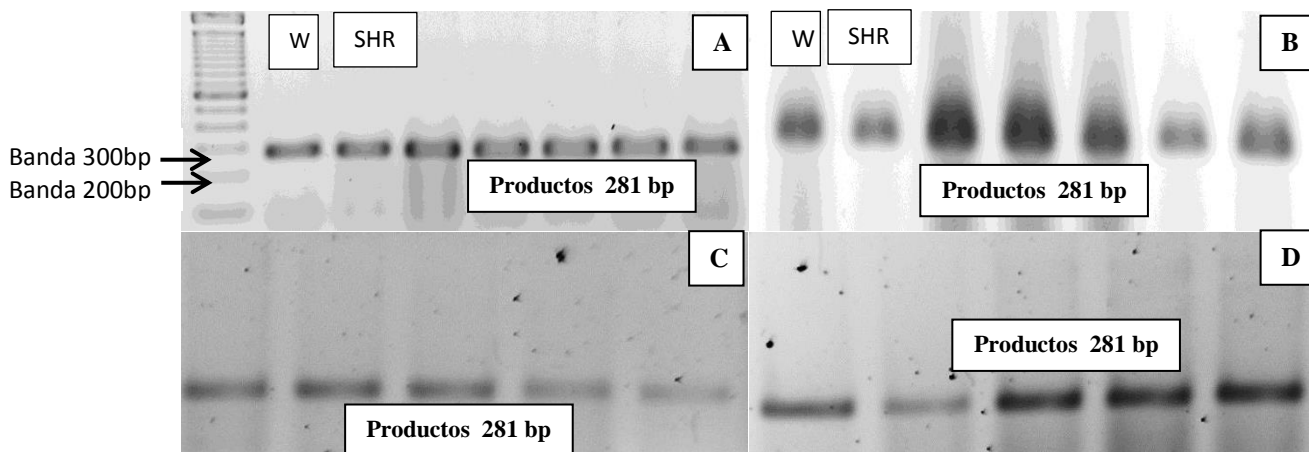


Figura 30.- Geles de Agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. A. Expresión de ECA2 en Ventrículo, grupo tratado con Captopril. B. Expresión de ECA2 en Ventrículo, grupo tratado con LQM-319. C. Expresión de ECA2 en Aorta, grupo tratado con Captopril. D Expresión de ECA2 en Aorta, grupo tratado con LQM-319. *W= Rata Wistar (Testigo) y SHR= Rata Espontáneamente Hipertensa (Control).

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica con alta prevalencia alrededor del mundo y en nuestro país, considerada como el principal factor de riesgo de muerte debido a que promueve cardiopatías y accidentes cerebrovasculares.

El uso de la cepa de ratas espontáneamente hipertensas fue debido a que otorgan un modelo experimental muy útil que desarrolla hipertensión y se caracteriza por cambios estructurales y funcionales en el corazón. La proporción del corazón con la masa corporal o el peso relativo del ventrículo izquierdo, son indicadores de hipertrofia ventricular a nivel de órgano, esto ha sido reportado por varios autores como elevado en SHR. La hipertrofia cardiaca esta correlacionada con un proceso inflamatorio, lo que sugiere que la inflamación podría ser un evento clave en complicaciones cardiovasculares en animales hipertensos [7].

Los genes de los componentes del Sistema Renina-Angiotensina han sido considerados prioritariamente como genes candidatos a estar asociados con la HTA, ya que dicho sistema desempeña un papel crucial en la homeostasis de las sales y del agua y en el mantenimiento del tono vascular [6], de aquí la importancia en conocer la expresión de ECA y ECA2 en distintos tejidos y bajo diferentes tratamientos.

En el lote testigo (rata Wistar), de aorta y ventrículo, la expresión de la ECA es muy pequeña y corresponde a los valores normales que se presentan en individuos sanos de esta especie, mientras que los niveles de ECA en el lote control (SHR), se encuentran elevados ya que esta enzima se encuentra en sobreexpresión en la hipertensión arterial, pues se sabe que uno de los factores que producen el desarrollo de esta enfermedad es la excesiva actividad del SRA [7].

Para la ECA2 del lote testigo, en ventrículo y aorta, la expresión es la presentada en individuos sanos de esta especie y corresponde a lo reportado en la literatura donde se

indica que es mayor la expresión de esta enzima en corazón y menor en vasos sanguíneos [66]. Mientras que en el lote control la expresión de ECA2 es un poco menor para ambos tejidos lo cual ya ha sido reportado y se le ha relacionado con el desequilibrio en el SRA que promueve el avance de la HTA, esto es debido a que menores niveles de ECA2 propician mayor cantidad de Ang II y con ello se desencadena el aumento de la presión arterial [113].

El efecto obtenido con el tratamiento de captopril y del compuesto LQM-319, sobre la expresión a nivel de *ARNm* de ECA en aorta y ventrículo puede atribuirse a que los IECA actúan inhibiendo a la Enzima Convertidora de Angiotensina al unirse al sitio activo de la enzima [104,107], por lo que se impide la formación de Ang II lo que impide que ésta se una a su receptor AT1, suprimiendo la activación de Proteína Cinasa C (PKC) [114], deteniendo la vía de las Proteín-Cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [115], lo cual inhibe la actividad de la proteína *Elk-1*, la cual actúa como factor de transcripción para *Erg-1* y *c-Jun*, los cuales a su vez, también, son factores de transcripción que se une a la promotor del gen de la ECA [116,117,118], con lo que se provoca una disminución en la expresión a nivel transcripcional de la enzima; por otro lado al inhibir la vía de MAPKs se inhibe la formación del NF- κ B, el actúa como promotor de Angiotensinógeno, por lo que disminuye la fuente de este precursor de Angiotensina I [26].

Otra explicación, aún no completamente elucidada, por la que los IECA, como el captopril y posiblemente el compuesto LQM-319, podrían generar una disminución del *ARNm* de ECA, es al estimular, mediante un mecanismo desconocido, que la Proteína Cinasa CK2 fosforile el residuo de *Ser1270* de la ECA unida a la cadena pesada de la Miosina no muscular tipo IIA (MYHIIA) y de esta forma afecte a la cinasas c-Jun N-Terminal (JNK), que se encuentran asociadas a ECA-MYHIIA dentro de la membrana citoplasmática [119], por lo que se alteraría la expresión del factor de transcripción *c-Jun* y *Erg-1* que participan en la expresión de ECA [120].

En cuanto a los resultados obtenidos por el Captopril sobre la niveles de expresión de ECA2, en los cuales no se ve un cambio en comparación con el testigo, es debido a que los IECA, como el Ramipril, no afectan la expresión en del *ARNm* de ECA2 en tejido cardiaco y en infarto al miocardio [121]. Esta explicación podría aplicar de manera similar para el compuesto LQM319 en su efecto sobre ventrículo, donde no hubo cambio alguno en los niveles de *ARNm* de ECA2, pero en aorta, el compuesto generó el aumento en los niveles de expresión de la enzima lo cual difiere de la actividad común de un IECA, esto podría tener varias explicaciones, una de ellas es debido a la diferencia entre los tejidos utilizados para la evaluación de la ECA2 ya que se tiene reportado que el tratamiento con Perindopril en Fibrosis Hepática y Daño Severo al Hígado genera un aumento en los niveles del *ARNm* de ECA2 [122,123], también se ha visto que el Lisinopril en tejido renal genera la disminución de la expresión de la enzima a nivel transcripcional cuando se encuentra acompañado de una dieta baja en sodio [124]; por lo que las diferencias entre los tejidos analizados, el modelo de enfermedad cardiovascular crónica y las condiciones bajo las que se encuentra podrían ser las causas de los distintos resultados obtenidos.

Una razón más a la cual puede atribuirse este efecto sobre ECA2 en Aorta es a una posible actividad aún desconocida del compuesto LQM319 sobre la cascada de señalización para la transcripción de la ECA2, pues se sabe que los IECA tienen una actividad sobre la CK2 [125], por mecanismos aún desconocidos, esta proteína-quinasa actúa sobre el Factor de Respuesta al Suero (SRE) [126], el cual es necesario para la formación de la proteína *c-Fos*, que es uno de los factores de los que depende la transcripción de la ECA2 [66, 127, 128]. Para comprobar esto se requieren más estudios sobre esta vía.

Otro factor de gran importancia que nos indica alguna alteración dentro del SRA son los niveles de sus componentes tanto a nivel de proteína como de ARN. En ventrículo del lote testigo los niveles de *ARNm* de ECA se encontraron visiblemente

disminuidos y los de ECA2 aumentados lo que un indicativo de que el sistema que regula la presión arterial se encuentra en equilibrio, al contrario del lote SHR donde los niveles de ECA se encuentran muy elevados y los de ECA2 no presentan cambio, lo que nos señala que la sobreexpresión de la ECA conlleva a mantener la presión arterial elevada a propiciar un mayor desequilibrio del SRA; en cambio bajo el tratamiento con Captopril y LQM319 los niveles de ECA y ECA2 regresaron a ser similares a los del lote testigo sano con lo que se corrobora que los IECA poseen un efecto que revierte el desequilibrio en el SRA [129].

En aorta los efectos son similares a los presentados en ventrículo, excepto en el caso del compuesto LQM319 donde genero una sobreexpresión de la ECA2 en comparación con el testigo sano, esto nos puede indicar que a nivel de este tejido sus efectos terapéuticos van más allá de la inhibición de la expresión de la ECA y propicia la formación de ECA2, que en algunos modelos ya estudiados se sabe que una relación de $ECA2 > ECA1$ promueve mejores efectos sobre la HTA y una recuperación en menor tiempo del equilibrio en el SRA [113, 129, 130].

Por último es de gran importancia el considerar el efecto adicional que presentó el compuesto LQM319 en aorta, en comparación con el captopril, al aumentar los niveles de expresión de la ECA2, ya que el mecanismo regulador de la presión arterial que posee esta enzima es mediante la formación de Ang 1-7 a partir de Ang II con lo que se disminuyen los niveles de este potente vasoconstrictor, por otra parte la Ang 1-7 se une a su receptor MAS con lo que se activa la vía de Akt que estimula a la eNOS la cual se encarga de producir NO a partir de L-arginina, este gas activa a la Guanilato ciclasa soluble, por lo que se genera un aumento de los niveles de GMPc, el cual activa a PKG que se encarga de fosforilar los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, canales de K^+ y al receptor de rianidinas de retículo sarcoplásmico con lo que se produce un efecto vasodilatador en los vasos sanguíneos[67, 68, 69].

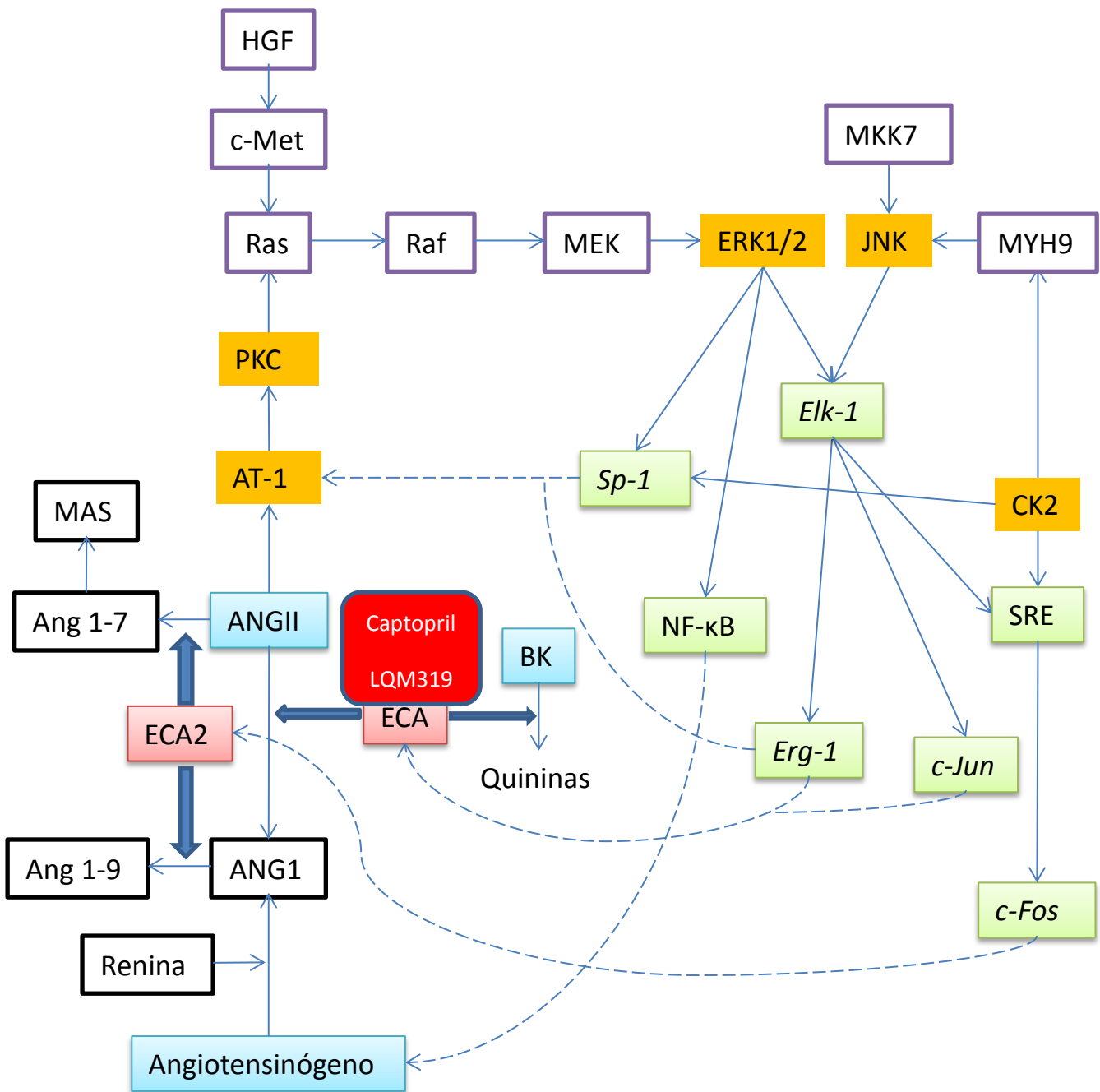


Figura 23.- Esquema que representa el posible mecanismo por el cual el captopril y el compuesto LQM319 (rojo) al inhibir a la ECA detiene la síntesis de Ang II que al no unirse a su receptor AT1 impide la formación de la PKC por lo que no se desencadena la vía de la MAPK y se inhibe la formación de factores de transcripción específicos de la ECA y ECA2 impidiendo la expresión de sus respectivos *ARNm* [57, 66, 116, 117, 118, 127, 128].

8. CONCLUSIÓN

Se estandarizó la técnica de RT-PCR para ECA y ECA2 en aorta y ventrículo de rata espontáneamente hipertensa, utilizando como método de extracción del ARN la técnica del Trizol.

El efecto del Captopril y del compuesto LQM-319 fue la disminución de los niveles de expresión de ECA en aorta y ventrículo de SHR, siendo semejantes a los del testigo sano (rata Wistar).

Ambos tratamientos no produjeron cambio alguno sobre los niveles de expresión de ECA2 en ventrículo; en aorta los niveles de expresión de ECA2 se vieron aumentados por el compuesto LQM319 pero no con el Captopril.

Se propone que el compuesto LQM319 probablemente actúa en aorta sobre ERK1/2 alterando la expresión de ECA2, para comprobar esta hipótesis se requieren de más estudios sobre la señalización en la cascada del SRA.

El compuesto [4-tert-butil-2, 6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol], actúa en ventrículo y aorta, alterando la expresión a nivel de ARN mensajero de la ECA y ECA2 en SHR.

9. REFERENCIAS

- 1.- INSP, Secretaría de Salud, et al. (2012). *Encuesta Nacional de Salud 2012, Resultados Nacionales*. México. Recuperado de: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- 2.- Santeliz, H.; Romano, L.; González, A. y Hernández, H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Rev Mex Cardiol*, 19(1), 21-29.
- 3.- Montes, G. (2005). *Síntesis de derivados tiomorfolínicos LQM 317, 318, 319, 320, 321 y 326 con actividad antihipertensiva*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 4.- Orozco, N. (2010). *Efecto del compuesto LQM319 y captopril en la contracción muscular producida por angiotensina I y angiotensina II en presencia de angiotensina 1-7 en aorta de rata hipertensa espontánea*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 5.- Vázquez, V.; et al. (2008). *Docking studies of a new heterocyclic methylthiomorpholin phenols derivatives as Antihypertensive drugs with ACE target. Case FESCdipine II*. Recuperado de: <http://mms.technologynetworks.net/posters/0507.pdf>
- 6.- Bernátová, I.; Pechánová, O. y Simko, F. (1999). Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Experimental Physiology*, 84, 1095-1105.
- 7.- Carrasco, J.; Zambrano, S.; Blanca, J.; Mate, A. y Vázquez, C. (2010). Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB. *Journal of Inflammation*, 7(21), 1-9.
- 8.- Thews, G. y Mutschler, E. (1983). *Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre: manual para farmacéuticos y biólogos*. Barcelona: Reverté.
- 9.- Moore, K. y Agur, A. (2a Ed.). (2003). *Fundamentos de Anatomía con Orientación Clínica*. Madrid: Médica Panamericana.

- 10.- Sunthareswaran, R. y Fagan, T. (2a Ed.). (2003). *Lo esencial en Sistema Cardiovascular*. Madrid: Elsevier.
- 11.- Palastanga, N.; Field, D. y Soames, R. (3a Ed.). (2007). *Anatomía y movimiento humano. Estructura y Funcionamiento*. Barcelona:Paidotribo.
- 12.- Aaronson, P.; Ward, J. y Connolly, M. (4a Ed.). (2012). *The Cardiovascular System at a Glance*. Massachusetts: Wiley-Blackwell.
- 13.- Johnson, R.; Thomas, A. y Bass, P. (2a Ed.). (2010). *The Cardiovascular System*. Oxford: Elsevier.
- 14.- Welsch, U. (2a Ed.). (2010). *Histología*. Madrid: Medica Panamericana.
- 15.- Latarjet, M. y Liard, A. (4a Ed.). (2005). *Anatomía Humana*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- 16.- Fuentes, X.; Castiñeiras, M. y Queraltó, J. (2a Ed.). (1998). *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. Barcelona: Reverté.
- 17.- Billat, V. (2002). *Fisiología y metodología del entrenamiento. De la teoría a la práctica*. Barcelona: Paidotribo.
- 18.- Banerjee, N. (2006). *Tensión Arterial: Etiología y Tratamiento*. New Delhi: Jain Publishers.
- 19.- Tigerstedt R. y Bergman, P. (1898). Nere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, 8, 223-271.
- 20.- Goldblatt, H. (1937). Studies on experimental hypertension. V-The pathogenesis of experimental hypertension due to renal ischemia. *Ann Int Med*, 11, 69-103.
- 21.- Lima, M.; et al. (2010). Sistema Renina Angiotensina y riesgo Cardio-metabólico, Revisión. *Rev Venez Endocrinol Metab*, 8(1), 3-10.

- 22.- Kageyama, R.; Ohkubo, H. y Nakanishi, S. (1984). Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry*, 23(16), 3603-3609.
- 23.- Angiotensinogen precursor – Homo Sapiens (Human). (s.f.). En *UniProtKB.org*. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01019>
- 24.- AGT Gen| ANGT Protein | ANGT Antibody. (s.f.). En *Genecards.org*. Recuperado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AGT&search=angiotensinogen>
- 25.- Jeunemaitre, X.; et al. (1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*, 71, 169-180.
- 26.- Takase, O.; et al. (2005). NF-kappaB-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. *Kidney Int*, 68(2), 464-473.
- 27.- Brasier, A. y Li, J. (1996). Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*, 27(3 Pt 2), 465-475.
- 28.- Schnermann, J. y Briggs, J. (1999). The macula densa is worth its salt. *J Clin Invest*, 104(8), 1007-1009.
- 29.- Hsueh, W. y Baxter, J. (1991). Human prorenin. *Hypertension*, 17(4), 469-477.
- 30.- Jan, A.; Batenburg, W. y Van, J. (2007). Prorenin and the (pro) renin receptor, an update. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 1288-1292.
- 31.- Nguyen, G.; Burckle, C. y Sraer, J. (2003). The renin receptor: the facts, the promise and the hope. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12, 51-55.
- 32.- Batenburg, W. y Jan, A. (2008). The (Pro) renin receptor: a new addition to the renin-angiotensin system? *Eur J Pharmacol*. 585, 320-324.
- 33.- Braun, E.; Fasciolo, J. y Leloir, L. (1940). The substance causing renal hypertension. *J Physiol (Lond)*, 98, 283-298.

- 34.- Hunyady, L. y Catt, K. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*, 20, 953-970
- 35.- Unger, T. y Li, J. (2004) The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 5(1), 7-10.
- 36.- Takai, S.; et al. (2004). Therapeutic applications of chymase inhibitors in cardiovascular diseases and fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 501(1-3), 1-8.
- 37.- Lansang, M.; et al. (2005). ACE and non-ACE pathways in the renal vascular response to RAS interruption in type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int*, 67(3),1033-1037.
- 38.- Richard, V.; et al. (2001). Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. *Circulation*, 104(7), 750-752.
- 39.- Ardaillou, R.; y Chansel, D. (1997). Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int*, 52(6),1458-1468.
- 40.- Ferrario, C.; et al. (1997). Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 30(3 Pt 2), 535-541.
- 41.- Liu, D.; et al. (2008). The Role of Oxidant Stress on AT1 Receptor Expression in Neurons of Rabbits with Heart Failure and in Cultured Neurons. *Circ Res*, 103-110.
- 42.- Barlucchi, L.; et al. (2001). Canine ventricular myocytes possess a renin-angiotensin system that is up-regulated with heart failure. *Circ Res*, 88, 298-304
- 43.- Touyz, R. y Schiffrin, E. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, 52, 639-672.
- 44.- De Gasparo, M.; et al. (2000). International union of pharmacology, XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 415-472.
- 45.- Siragy, H. (2009). The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection. *Curr Hypertens Rep*, 11, 260-262

- 46.- Olivares, J.; et al. (2005). Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors. *Mol Pharmacol*, 68, 356-364.
47. Arellano, A.; et al. (2010). Angiotensin-induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. *Biochem Pharmacol*, 79, 733-745.
- 48.- Dostal, D.; y Baker, K. (1999). The cardiac rennin-angiotensin system. Conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*, 85, 643-645.
- 49.- Schneider, M. y Lorell, B. (2001). AT2, judgment day: Wich angiotensin receptor is the culprit in cardiac hypertrophy? *Circulation*, 104, 247-248.
- 50.- Henrion, D.; Kubis, N. y Lévy, B. (2001). Physiological and pathophysiological functions of the AT2 subtype receptor of angiotensin II. From large arteries to the microcirculation. *Hypertension*, 38, 1150-1157.
- 51.- Blaukat, A. (2003). Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia*, 35, 17–23.
- 52.- Golias, C.; et al. (2007). The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system – bradykinin. *Hippokratia*, 11(3), 124–128.
- 53.- Bas, M.; et al. (2007). Nonallergic angioedema: role of bradykinin. *Allergy*, 62(8), 842-856.
- 54.- Bascands, J.; Schanstra, J.; Couture, R. y Girolami, J. (2003). Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. *Med Sci*, 19, 1093–1100.
- 55.- Wu, J.; Akaike, T.; Hayashida, K.; et al. (2002). Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *Int J Cancer*, 98, 29–35.
- 56.- Angiotensin-converting enzyme precursor – Homo Sapiens (Human). (s.f.). En *UniProtKB.org*. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P12821>
- 57.- ACE Gen| ACE Protein | ACE Antibody. (s.f.). En *Genecards.org*. Recuperado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE&search=angiotensin+converting+enzyme>

- 58.- Wein, A.; et al. (9a Ed.). (2008). *Urología, Campell-Walsh*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- 59.- Oliveri, E. y Thierer, J. (1999). *Insuficiencia Cardíaca*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- 60.- Lindpaintner, K.; et al. (1995). A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*, 332, 706-711.
- 61.- Ehlers, M.; Chen, Y. y Riordan, J. (1991). Purification and characterization of recombinant human testis angiotensin-converting enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif*, 2(1), 1-9.
- 62.- Perich, R.; et al. (1992). Two binding sites on angiotensin converting enzyme: evidence from radioligand binding studies. *Molecular Pharmacol*, 42, 286-293.
- 63.- Kumar, R.; et al. (1989). Structure of testicular angiotensin-converting enzyme: A segmental isozyme. *J Biol Chem*, 264, 16754-16758.
- 64.- Beldent, V.; et al. (1993). Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J Biol Chem*, 268, 26428-26434.
- 65.- Angiotensin-converting enzyme 2 precursor – Homo Sapiens (Human). (s.f.). En *UniProtKB.org*. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1>
- 66.- ACE2 Gen| ACE2 Protein | ACE2 Antibody. (s.f.). En *Genecards.org*. Recuperado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE2>
- 67.- Santos, R.; Campagnole, M. y Andrade, S. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*, 91, 45-62.
- 68.- Ingelfinger, J. (2009). Angiotensin – converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 18, 79 – 84.
- 69.- Soler, M.; Wysocki, J. y Batlle, D. (2007). Angiotensin converting enzyme 2 and the kidney. *Exp Physiol*, 93, 549-555.

- 70.- Donoghue, M.; et al. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87(5), 1-9.
- 71.- Harmen, D.; Gilbert, M.; Borman, R. y Clark, K. (2002). Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*, 532(1-2), 107-110.
- 72.- Contreras, F.; et al. (2000). Aspectos Funcionales del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona y Bloqueantes de los Receptores ati de Angiotensina II en Hipertensión Arterial. *AVFT*, 19(2), 121-128.
- 73.- Gamboa, R. y Rospigliosi, A. (2010). Más allá dela Hipertensión Arterial. *Acta Med Per*, 27(1), 45-52.
- 74.- Fernández, F.; Alcázar, J. y Sánchez, E. (2010). *Hipertensión Arterial Secundaria*. Madrid: Nefrología Digital.
- 75.- Botey, A. y Boch, P.(2000). Hipertensión Maligna. *Hipertensión*, 17(5), 198-207.
- 76.- Hergueta, G.; et al. (2002). (2ª Ed.). *Hipertensión Arterial, Guía de*. Madrid: Ediciones Norma Capitol.
- 77.- Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999. (s.f.). En *Salud.gob.mx* Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/030ssa29.html>
- 78.- Hunt, S.; Williams, R. y Barlow, G. (1986). A comparison of positive family history definitions for defining risk of future disease. *J Chron Dis*, 39, 809-821.
- 79.- Inoue, I.; et al. (1997). A nucleotide sustitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest*, 99, 1786-1797.

- 80.- Redon, J.; et al. (2000). Influence of the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene on the outcome of microalbuminuria in essential hypertension. *Hypertension*, 35, 490-495.
81. Tamaki, S.; Iwai, N.; Tsujita, Y.; y Kinoshita, M. (1999). Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension*, 33, 266-270.
- 82.- Blair, D.; et al. (1984). Evidence for an increased risk for hypertension with centrally located body fat and the effect of race and sex on this risk. *Am J Epidemiol*, 119, 526-540
- 83.- INTERSALT. (1988). Co-operative Research Group. Sodium, potassium, body mass, alcohol and blood pressure: the INTERSALT study. *J Hypertens*, 6(4), 584-586
- 84.- Geleijnse, J.; et al. (1997). Long-term effects of neonatal sodium restriction on blood pressure. *Hypertension*, 29, 913-917.
- 85.- Green, D.; et al. (2002). Serum potassium level and dietary potassium intake as risk factors for stroke. *Neurology*, 59, 314.
- 86.- Naoki, F.; et al. (2012). Effect of ageing on left ventricular compliance and distensibility in healthy sedentary humans. *J Physiol*, 590(8), 1871–1880.
- 87.- Ghiadoni, L.; et al. (2000). Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*, 102, 2473-2478.
- 88.- Bellin, L.; Puddey, I. y Burke, V. (1996). Alcohol and hipertensión. Kill or cure? *J Hum Hypertens*, 10(2), S1-S5.
- 89.- Kannel, W. y Higgins, M. (1990). Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. *J Hypertens*, 8 (5), 3-8.
- 90.- Hipertensión. (2013). En *Panamerican Health Organization*. Recuperado de: <http://www.paho.org/hipertension/>

- 91.- WHO. (2013). *Información general sobre la Hipertensión en el mundo*. Ginebra: WHO Document Production Services.
- 92.- Whelton, P.; et al. (2002). Primary prevention of hypertension: Clinical and public health advisory from the National High Blood Pressure Education Program. *JAMA*, 288, 1882.
93. Hooper, L.; Bartlett, C.; Smith, G. y Ebrhahim, S. (2002). Systemic review of long term effects of advice to reduce dietary salt in adults. *BMJ*, 325, 628.
94. Willet, W.; Dietz, W. y Colditz, G. (1999). Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med*, 341, 427.
- 95.- De la Figueroa, M. y Vinyoles, E. (2006). Inhibidores de la Renina. *Hipertensión*, 23(7), 216-221.
- 96.- Stanton, A. (2003). Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*, 3(6), 389-394.
- 97.- Fernandez, G.; et al. (2004). Nuevas consideraciones sobre aspectos clásicos del uso de los β -bloqueadores en la hipertensión arterial. *MAPFRE MEDICINA*, 15(2), 141-147.
- 98.- Rodríguez, C.; et al. (2002). Utilización de betabloqueadores en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. *An. Med. Interna*, 19(7), 50-56.
- 99.- Bernis, C. (2010). Diuréticos y Fracaso Renal Agudo. *NefroPlus*, 3(3), 1-8.
- 100.- Tratamiento Farmacológico – Diuréticos. (s.f.). En *Cardiofamilia.org*. Recuperado de: <http://www.cardiofamilia.org/tratamiento-insuficiencia-cardiaca/tratamiento-farmacologico-diureticos.html>
- 101.- Usufs, F. y D'Phill, C. (1995). Calcium antagonist in coronary artery disease and hypertension. *Circulation*, 92, 1079-1082.
- 102.- Alderman, M.; et al. (1997). Effect of long-acting and short-acting calcium antagonist on cardiovascular outcomes in hypertensive patients. *Lancet*, 349, 594-598.

- 103.- García, R.; Hernandez, D. y García, D. (2000). Nitratos Orgánicos en su Segundo Siglo. *Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovasc*, 14(2), 141-150.
- 104.- Gorostidi, M.; et al. (2002). Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. Una revisión farmacoterapéutica. *Hipertensión*, 19(3), 129-133.
- 105.- Burnier, M. y Brunner, H. (2000). Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet*, 355(9204), 637-645.
- 106.- Gums, J. (1992). Use of ACE Inhibitors in the treatment of cardiovascular disease. *American Pharmacy*, 32(6), 187-192.
- 107.- Gordon, H. (1988) Converting Enzyme Inhibitors in Treatment of Hipertension. *New Engl J Med*, 319, 1517-1523.
- 108.- Vázquez, A.; et al. (1998). Inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina en el tratamiento de la hipertensión arterial. *Revisión. Rev Cubana Farm*, 32(3), 204-210.
- 109.- Magos, A. y Lorenzana, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*, 52(6), 260-264.
- 110.- Investigación de Fármacos. (s.f.). En *Med.ufro*. Recuperado de: http://www.med.ufro.cl/Recursos/farmacologia-clinica/Salvaticifarmacos_%20inicio_a_fin.pdf
- 111.- Quillo, M. (2011). *Efecto en la inhibición de la proliferación, de los compuestos LQM 319 y LQM 402, sintetizados en la FES-Cuautitlán, sobre líneas celulares transformadas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 112.- Rocha, Y. (2008). *Estudio genotóxico mediante la prueba micronúcleos del compuesto tiomorfolínico LQM 319*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

- 113.- Zhen, T.; Wu, J. y Ma, H. (2011). Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1–7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 12(4).
- 114.- Villard, E.; et al. (1998). Induction of Angiotensin I-converting Enzyme Transcription by a Protein Kinase C-dependent Mechanism in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), 25191–25197.
- 115.- Eickels, V.; et al. (1999). Angiotensin converting enzyme inhibitors block mitogenic signalling pathways in rat cardiac fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359(5), 394-399.
- 116.- Day, R.; et al. (2001). Bleomycin Upregulates Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme via Mitogen-Activated Protein Kinase and Early Growth Response 1 Transcription Factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 25, 613–619.
- 117.- Snyder, R. y Thekkumkara, T. (2013). Interplay Between Egr-1 and Sp1 Critical for 13-cis Retinoic Acid Mediated Transcriptional Repression of Angiotensin Type 1A Receptor. *J Mol Endocrinol*, 50(3), 361–374.
- 118.- Eyries, M.; et al. (2002). Phorbol Ester Induction of Angiotensin-Converting Enzyme Transcription Is Mediated by Egr-1 and AP-1 in Human Endothelial Cells via ERK1/2 Pathway. *Circ Res*, 91, 899-906.
- 119.- Kohlsted, K.; et al. (2006). Signaling via the Angiotensin-Converting Enzyme Results in the Phosphorylation of the Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA. *Mol Pharmacol*, 69, 19–26,
- 120.- Fleming, I. (2006). Signaling by the Angiotensin-Converting Enzyme. *Circ Res*, 98, 887-896.
- 121.- Burrell, L.; et al. (2005). Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *European Heart Journal*, 26, 369–375

- 122.- Paizis, G.; et al. (2005). Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut*, 54, 1790-1796.
- 123.- Huang, M.; et al. (2010). Upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in hepatic fibrosis by ACE inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37(1), e1-6.
- 124.- Hamming, I.; et al. (2008). Differential regulation of renal ACE2 and ACE during ACE inhibition and dietary sodium restriction in healthy rats. *Exp Physiol*, 93(5), 631-638.
- 125.- Ryan, M. y Sigmund, C. (2004). ACE, ACE Inhibitors, and Other JNK. *Circ Res*, 94, 1-3.
- 126.- Chang, C. y Chao, C. (2013). Protein kinase CK2 enhances Mcl-1 gene expression through the serum response factor-mediated pathway in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*, 91(6), 808-817.
- 127.- Zucker, I. (2008). Angiotensin-Converting Enzyme 2: A New Player in Central Sympathetic Regulation? *Circ Res*, 102, 628-629.
- 128.- Gallagher, P.; Ferrario, C. y Tallant, E. (2008). Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(6), H2373–H2379.
- 129.- Koka, V.; et al. (2008). Angiotensin II Up-Regulates Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE), but Down-Regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP Kinase Pathway. *Am J Pathol*, 172(5), 1174–1183.
- 130.- Tikellis, C. y Thomas, M. (2012). Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *International Journal of Peptides*, 2012, 1-8.
- 131.- TRIzol® Reagent. En *Lifetechnologies.com*. (2012). Recuperado de: tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

132.- Li, N., Zimpelmann, J., Cheng, K., Wilkins, J. y Burns, K. (2004). The Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 in the generation of Angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 288, 353-362. doi: 10.1152/ajprenal.00144.2004

133.- Primer Blast. (s.f.) En: *NCBI: PrimerBlast*. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

ANEXO

No. de Ciclos	OD
20	65.281
25	359.87
30	562.02
35	665.59
40	701.14

Tabla 10.- Gradiente de expresión de GAPDH de acuerdo al número de ciclos.

No. de Ciclos	OD
35	543.75
40	623.73
45	943.38
50	952.39
55	967.17

Tabla 11.- Gradiente de expresión de ECA1 de acuerdo al número de ciclos.

Temperatura	OD
53	99.947
55	105.26
57	77.73
59	50.71
62	54.6

Tabla 12.- Alineamiento de Primers de ECA1 a distintas temperaturas.

No. de Ciclos	OD
30	98.77
35	284.94
40	315.63
45	719.52

Tabla 13.- Gradiente de expresión de ECA2 de acuerdo al número de ciclos.

Wistar	SHR	Captopril	LQM-319
0.507	0.5435	0.4734	0.453

Tabla 14.- Promedio de la expresión de GAPDH en OD (Unidades Relativas) en Ventrículo para los lotes control y tratamiento.

Origen de Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad
<i>Entre los Grupos</i>	0.007794	3	0.002598	4.698	0.0216
<i>Dentro de los grupos</i>	0.006636	12	0.0005530		
<i>Total</i>	0.01443	15			

Tabla 15.- ANOVA para los grupos de expresión de GAPDH en Ventrículo.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
Wistar vs SHR	0.8507	No
Wistar vs Captopril	2.306	No
Wistar vs LQM-319	1.863	No

Tabla 16.- Determinación de la significancia P<0.05 para GAPDH en Ventrículo por comparación de grupos con Wistar.

Wistar	SHR	Captopril	LQM-319
0.0159	0.2356	0.0080	0.0083

Tabla 17.- Promedio de la expresión de ECA1/GAPDH (Unidades relativas) en Ventrículo para los lotes control y tratamiento.

Origen de Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad
<i>Entre los Grupos</i>	0.08775	3	0.02925	614.3	< 0.0001
<i>Dentro de los grupos</i>	0.0004761	10	0.00004761		
<i>Total</i>	0.08823	13			

Tabla 18.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA1 en Ventrículo.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
Wistar vs SHR	31.84	Sí
Wistar vs Captopril	1.366	No
Wistar vs LQM-319	1.310	No

Tabla 19.- Determinación de la significancia P<0.05 para ECA1 en Ventrículo por comparación de grupos con Wistar.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
SHR vs Wistar	31.84	Sí
SHR vs Captopril	39.42	Sí
SHR vs LQM-319	39.36	Sí

Tabla 20.- Determinación de la significancia P<0.05 para ECA1 en Ventrículo por comparación de grupos con SHR.

Wistar	SHR	Captopril	LQM-319
0.5468	0.4937	0.4698	0.4460

Tabla 21.- Promedio de la expresión de ECA2/GAPDH (Unidades relativas) en Ventrículo para los lotes control y tratamiento.

Origen de Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad
<i>Entre los Grupos</i>	0.01534	3	0.005114	2.101	0.1638
<i>Dentro de los grupos</i>	0.02434	10	0.002434		
<i>Total</i>	0.03969	13			

Tabla 22.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA2 en Ventrículo.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
Wistar vs SHR	1.078	No
Wistar vs Captopril	1.867	No
Wistar vs LQM-319	2.442	No

Tabla 23.- Determinación de la significancia P<0.05 para ECA2 en Ventrículo por comparación de grupos con Wistar.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
SHR vs Wistar	1.078	No
SHR vs Captopril	0.5783	No
SHR vs LQM-319	1.154	No

Tabla 24.- Determinación de la significancia P<0.05 para ECA2 en Ventrículo por comparación de grupos con SHR.

Wistar	SHR	Captopril	LQM-319
0.4500	0.4350	0.4580	0.4582

Tabla 25.- Promedio de la expresión de GAPDH en OD (Unidades relativas) en Aorta para los lotes control y tratamiento.

Origen de Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad
<i>Entre los Grupos</i>	0.0009204	3	0.0003068	1.183	0.3647
<i>Dentro de los grupos</i>	0.002593	10	0.0002593		
<i>Total</i>	0.003513	13			

Tabla 26.- ANOVA para los grupos de expresión de GAPDH en Aorta.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
Wistar vs SHR	0.9316	No
Wistar vs Captopril	0.5938	No
Wistar vs LQM-319	0.6087	No

Tabla 27.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para GAPDH en Aorta por comparación de grupos con Wistar.

Wistar	SHR	Captopril	LQM-319
0.00447	0.0962	0.0011	0.0008

Tabla 28.- Promedio de la expresión de ECA1/GAPDH (Unidades relativas) en Aorta para los lotes control y tratamiento.

Origen de Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad
<i>Entre los Grupos</i>	0.01540	3	0.005132	1863	< 0.0001
<i>Dentro de los grupos</i>	0.00002755	10	0.000002755		
Total	0.01542	13			

Tabla 29.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA1 en Aorta.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
Wistar vs SHR	55.31	Sí
Wistar vs Captopril	2.421	No
Wistar vs LQM-319	2.585	No

Tabla 30.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA1 en Aorta por comparación de grupos con Wistar.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
SHR vs Wistar	55.31	Sí
SHR vs Captopril	68.53	Sí
SHR vs LQM-319	68.69	Sí

Tabla 31.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA1 en Aorta por comparación de grupos con SHR.

Wistar	SHR	Captopril	LQM-319
0.1406	0.0549	0.2027	0.4602

Tabla 32.- Promedio de la expresión de ECA2/GAPDH (Unidades relativas) en Aorta para los lotes control y tratamiento.

Origen de Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad
<i>Entre los Grupos</i>	0.3464	3	0.1155	23.62	< 0.0001
<i>Dentro de los grupos</i>	0.05866	12	0.004889		
<i>Total</i>	0.4050	15			

Tabla 33.- ANOVA para los grupos de expresión de ECA2 en Aorta.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
Wistar vs SHR	1.151	No
Wistar vs Captopril	1.055	No
Wistar vs LQM-319	6.098	Sí

Tabla 34.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA2 en Aorta por comparación de grupos con Wistar.

Comparación	Valor crítico para F	Significancia P < 0.05
SHR vs Wistar	1.151	No
SHR vs Captopril	2.342	No
SHR vs LQM-319	7.385	Sí

Tabla 35.- Determinación de la significancia $P < 0.05$ para ECA2 en Aorta por comparación de grupos con SHR.