



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2 RENAL Y SU PARTICIPACIÓN EN LA  
REGULACIÓN DEL SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA DURANTE EL  
DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GUZMÁN HERNÁNDEZ ELIZABETH ALEJANDRINA**

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

**COMITÉ TUTOR: DR. VILLALOBOS MOLINA RAFAEL**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ALICIA SANCHEZ MENDOZA**  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MÉXICO, D.F. MARZO, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2 RENAL Y SU PARTICIPACIÓN EN LA  
REGULACIÓN DEL SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA DURANTE EL  
DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GUZMÁN HERNÁNDEZ ELIZABETH ALEJANDRINA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. IBARRA BARAJAS MAXIMILIANO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
**COMITÉ TUTOR: DR. VILLALOBOS MOLINA RAFAEL**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
**COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ALICIA SANCHEZ MENDOZA**  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MÉXICO, D.F. MARZO, 2015.**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de enero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **GUZMÁN HERNÁNDEZ ELIZABETH ALEJANDRINA**, con número de cuenta **402043757**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA COX-2 RENAL Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**:

Presidente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL  
Vocal: DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL  
Secretario: DRA. MARÍA ALICIA SÁNCHEZ MENDOZA  
Suplente: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO  
Suplente: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de enero de 2015.

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

# AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido a través de la beca (202693) que me otorgo para la realización de mis estudios de doctorado.

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

Agradezco a los miembros del comité tutorial.

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas

Dra. María Alicia Sánchez Mendoza

Dr. Rafael Villalobos Molina

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

# AGRADECIMIENTOS

Una pregunta realizada por mis compañeros que me han acompañado a lo largo de la escritura de esta tesis. La pregunta no era otra que cuando iba a empezar a escribir los agradecimientos y la respuesta siempre era la misma: una vez finalizada toda la escritura. La razón de esta decisión era poder tener la mente fría para echar la vista atrás y recordar como si fuera hoy todas las experiencias vividas desde el comienzo de mi “andadura” científica. Pues bien, ese momento ha llegado.

Después de hacer balance, he llegado a la conclusión que esas experiencias han sido muchas y buenas y si a alguien se las debo, es a todos las personas que han sido excelentes compañeros de viaje. Durante los 5 años que ha tardado en realizarse este trabajo mucha gente ha entrado y salido de mi vida, pero todos y cada uno de ellos han dejado en mayor o menor medida su marca. Tanto a nivel personal como a nivel científico muchas personas me han dado más de lo que ellas mismas se puedan imaginar y, aunque no sean conscientes, todas siguen y seguirán dentro de mi corazón durante el resto de mi vida. Por todo lo que estas personas me han aportado, sería injusto no reconocer su aportación a este trabajo.

Este trabajo de investigación quiero dedicarlo especialmente a toda mi familia el apoyo prestado, no solo durante el desarrollo de esta tesis, sino desde que di mi primer pasó en este mundo. Gracias a mis padres, Margarita y Severino, sin cuyo sacrificio, comprensión y confianza nunca podría haberse llevado a cabo esta

tesis. Gracias a mis hermanos, Elia, Daniel y Alberto, a mis sobrinos Grecia, Fernando, Carlitos y Gabriel, a mi chñado Fernando por la ilusión y esperanzas que han depositado en mí a lo largo de todos estos años.

Gracias a mis amigas Melisa, Paulina, al profesor David y compañeros de laboratorio que han compartido el día a día y de los cuales he tenido la suerte de aprender algo nuevo cada día.

“Cuando tengas que elegir entre dos caminos,  
pregúntate cual de ellos tiene corazón. Quien elige el  
camino del corazón no se equivoca nunca”

Popol Wuj

“A la voluntad, mas que a la inteligencia, se  
enderezan los consejos”

Santiago Ramon y Cajal



# Índice de contenido

<b>I.</b>	<b>Índice de figuras</b>	12
<b>II.</b>	<b>Abreviaturas utilizadas</b>	14
<b>III.</b>	<b>Resumen</b>	16
<b>IV.</b>	<b>Abstract</b>	17
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	20
1.1.	Hipertensión arterial	22
1.2.	Metabolismo del ácido araquidónico	24
1.2.1.	Vía de las ciclooxigenasas	25
1.2.2.	COX-1 y COX-2	25
1.2.2.1.	Estructura génica	25
1.2.2.2.	Estructura proteica	28
1.2.2.3.	Reacciones catalizadas por las ciclooxigenasas	29
1.2.2.4.	Expresión de COX-1 y COX-2	30
1.2.2.5.	COX-3	31
1.2.3.	Actividad biológica de los eicosanoides derivados de las ciclooxigenasas	31
1.2.3.1.	Productos de la vía de la ciclooxigenasa	31
1.2.3.2.	COX y el riñón	32
1.2.3.2.1.	Distribución de la COX-1/COX-2 y de sus metabolitos en el riñón	32
1.2.3.2.2.	Sintasa de prostaglandinas	32

1.2.3.2.3. Receptores de prostaglandinas	33
1.2.4. Acciones biológicas de los prostanoides	37
1.2.5. Acciones biológicas de los productos de la COX en el riñón	38
1.2.6. Regulación de la expresión de la ciclooxigenasa-2 en la mácula densa	42
1.2.7. Mecanismos generales de liberación de renina	44
1.2.7.1. Liberación de renina de las células yuxtaglomerulares	48
1.2.7.2. Participación de la COX-2 y del sistema renina angiotensina en la hipertensión arterial	49
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>53</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>54</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>54</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>55</b>
5.1. Objetivos específicos	55
<b>6. MÉTODOS</b>	<b>56</b>
6.1. REACTIVOS	56
6.1.1. Uso general	56
6.1.2. Uso específico	56
6.2. Material biológico	57
6.2.1. Estudios in vivo	57
6.2.1.1. Hipertensión arterial por deficiencia de óxido nítrico	57
6.2.1.2. Cuantificación de nitritos y nitratos urinarios de ratas hipertensas	58

6.3. Estudios in vitro	58
6.3.1. Producción renal de prostanoïdes de ratas normotensas e hipertensas	58
6.3.2. Medición de 6-ceto PGF <sub>1α</sub> y tromboxano B <sub>2</sub> en los perfusados renales	59
6.4. Experimentos de biología molecular	60
6.4.1. Extracción de RNA total	60
6.4.2. Síntesis de cDNA	60
6.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	60
6.5. Angiotensina II plasmática	61
6.6. Análisis estadístico	62

## **7. RESULTADOS**

7.1. Curso temporal de la excreción urinaria de nitritos y nitratos de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	63
7.2. Curso temporal de la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	65
7.3. Curso temporal de la expresión del RNAm de la COX-2 en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	67
7.4. Curso temporal de la expresión del RNAm de la renina en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	69

7.5. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ ) en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	70
7.6. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable del tromboxano ( $\text{TXB}_2$ ) en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	72
7.7. Efecto de la inhibición de la COX-2 y de la ECA sobre la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico por 2 y 19 días	73
7.8. Efecto de captopril y de celecoxib sobre la expresión del RNAm de la COX-2 y de la renina en ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días	75
7.9. Síntesis in vitro del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ ) y del metabolito estable del traomboxano ( $\text{TXB}_2$ ) en riñones aislados de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME por 2 y 19 días	78
7.10. Efecto de captopril y celecoxib sobre la concentración plasmática de Angiotensina II en ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días	80

## **8. DISCUSIÓN**

8.1. Hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	81
8.2. Expresión de la COX-2 renal de ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	83
8.3. Expresión de renina renal de ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	84

8.4. Participación de la prostaciclina y el tromboxano A <sub>2</sub> en la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	85
8.5. Efecto del celecoxib y del captopril sobre la presión arterial sistólica de ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días	86
8.6. Efecto del celecoxib y del captopril sobre la expresión de la COX-2 y de la renina de ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días	88
8.7. Efecto del celecoxib y del captopril sobre la síntesis de prostanoides en la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	90
8.8. Efecto de celecoxib y captopril sobre la expresión de angiotensina II plasmática en la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico	92
<b>9. CONCLUSIONES</b>	94
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	95
<b>Artículo: Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertesion.</b>	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de la expresión de las ciclooxigenasas, de las sintasas de prostaglandinas, y de los receptores de los prostanoides en la nefrona.	27
Figura 2. Rutas de señalización que regulan la expresión de COX-2.	36
Figura 3. Estructura del aparato yuxtglomerular.	45
Figura 4. Curso temporal de la excreción urinaria de nitritos y nitratos de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.	64
Figura 5. Curso temporal de la presión arterial sistólica de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.	66
Figura 6. Curso temporal de la expresión (RNAm) de la COX-2 de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.	68
Figura 7. Curso temporal de la expresión (RNAm) de renina de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.	69
Figura 8. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto-PGF <sub>1a</sub> ) de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.	71
Figura 9. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable del tromboxano (TXB <sub>2</sub> ) de ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.	72
Figura 10. Efecto de la inhibición de la COX-2 y de la ECA sobre la presión arterial sistólica de ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico por 2 y 19 días.	74
Figura 11. Efecto de captopril y de celecoxib sobre la expresión de la COX-2 y de la renina en ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días.	77
Figura 12. Síntesis in vitro del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto-PGF <sub>1a</sub> )	79

del metabolito estable del tromboxano (TXB<sub>2</sub>) de riñones aislados de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME por 2 y 19 días.

Figura 13. Efecto de captopril y celecoxib sobre la concentración plasmática de angiotensina II de ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días. 80

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
Ang II	Angiotensina II
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cDNA	DNA complementario
CML	Células musculares lisas
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
TFG	Tasa de filtración glomerular
HTA	Hipertensión arterial
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato
JGA	Aparato yuxtaglomerular
MBD	Dominio de unión a la membrana
MD	Mácula densa
Na <sup>+</sup>	Sodio
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> - 2Cl	Cotransportador NKCC2
NO	Óxido nítrico
TAL	Porción ascendente gruesa del asa de Henle
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasas



PGS	Prostaglandinas
PGH	Prostaglandina endoperóxido H sintasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
FSR	Flujo sanguíneo renal
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero

## RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica, degenerativa, y multifactorial que representa un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares ya que lesiona vasos sanguíneos cardiacos, renales y cerebrales. Estudios epidemiológicos han mostrado que en México una de cada tres personas adultas padece HTA. Por lo que es importante estudiar los mecanismos que se encuentran involucrados en el desarrollo de esta patología.

El riñón está involucrado en la génesis de la HTA; entre los mecanismos participantes en este proceso están involucrados los prostanoides sintetizados por la Ciclooxygenasa 2 (COX-2). El riñón es una fuente rica de prostaglandinas (PGS), formadas por el metabolismo del ácido araquidónico dependiente de las ciclooxigenasas; son mediadores fisiológicos de la hemodinámica glomerular renal y de la reabsorción tubular de sodio y agua. En la corteza renal existe una interacción entre la COX-2 y el sistema renina-angiotensina a través de la renina, enzima clave en la regulación de este sistema. Se ha observado que la COX-2 cortical renal a través de la producción de prostaglandinas vasodilatadoras, en particular la PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, son las responsables de estimular la expresión del RNAm y la secreción de renina de las células juxtaglomerulares.

Evidencias experimentales han mostrado que la COX-2 puede estar involucrada en el desarrollo de la HTA por deficiencia de óxido nítrico y en el daño vascular renal (glomérulo esclerosis, hiperfiltración) asociado con la producción excesiva de prostanoides y la activación del sistema renina-angiotensina. En el presente trabajo evaluamos el curso temporal de la expresión de la COX-2 cortical renal y su participación en la activación del sistema renina-angiotensina durante el desarrollo de la hipertensión inducida por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico. Para esto, se reprodujo un modelo de HTA por inhibición de la síntesis de óxido nítrico empleando ratas Wistar macho a las que se les administró, en el agua de beber, hidrocloreuro del éster metílico de la N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME) en diferentes tiempos, desde 1 hasta 33 días. La presión arterial sistólica (PAS) se

midió por el método pletismográfico; los riñones fueron aislados para determinar el RNAm de COX-2 y renina en la corteza mediante PCR-tiempo real, y los prostanoïdes derivados de COXs en el perfusado renal fueron determinados por ELISA y la angiotensina II plasmática se cuantificó por electroforesis capilar de zona.

Encontramos un incremento en el RNAm cortical para COX-2 y renina desde el día 2 de tratamiento con L-NAME. La expresión máxima del RNAm de ambas enzimas se alcanzó entre los días 19 al 25; así, el tratamiento con L-NAME incrementó la prostaciclina renal (PGI<sub>2</sub>) y la Ang II plasmática en 2 y 19 días. En algunas ratas, el bloqueo del óxido nítrico fue llevado a cabo de manera conjunta con la administración oral del inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina captopril (30 mg/kg/día) o el inhibidor específico de la COX-2: celecoxib (1 mg/kg/día).

El captopril previno el incremento de la presión sanguínea, efecto asociado con la disminución de Ang II plasmática e incrementado de PGI<sub>2</sub> derivada de COX-2. El tratamiento con celecoxib previno el incremento de la presión sanguínea, efecto asociado con la disminución de prostaciclina y Ang II plasmática.

Estos hallazgos sugieren que la expresión temprana de COX-2 en el riñón conduce a incremento en la formación de PGI<sub>2</sub>, la cual está involucrada en la regulación del sistema renina angiotensina durante la hipertensión inducida por L-NAME.

## ABSTRACT

High blood pressure (HBP) is a chronic, degenerative, and multifactorial disease that represents a risk factor for cardiovascular disease because it injures cardiac, renal and cerebral blood vessels. Epidemiological studies in Mexico have shown that one in three adults suffers from hypertension. So it is important to study the mechanisms that are involved in the development of this pathology. The kidney is involved in the genesis of hypertension; between mechanisms involved in this process are involved prostanoids synthesized by cyclooxygenase 2 (COX-2). The kidney is a rich source of prostaglandins (PGS), formed by the metabolism of cyclooxygenase dependent arachidonic acid; are physiological mediators of renal glomerular hemodynamics and the tubular reabsorption of sodium and water. In the renal cortex there is interaction between the COX-2 and the renin-angiotensin system through renin, a key enzyme in the regulation of this system. It has been observed that COX-2 renal cortical through vasodilatory prostaglandin production, especially PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>, are responsible for stimulating the expression of mRNA and the secretion of renin from the juxtaglomerular cells. Experimental evidence has shown that COX-2 may be involved in the development of hypertension by nitric oxide deficiency and the (glomerular sclerosis, hyperfiltration) renal vascular damage associated with excessive production of prostanoids and activation of the renin-angiotensin. In this paper we evaluate the time course of expression of renal cortical COX-2 and its involvement in the activation of the renin-angiotensin system during development of hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthesis. For this, a hypertension model was reproduced by inhibition of nitric oxide synthesis in using male Wistar rats which were administered in the drinking water, methyl ester hydrochloride of the N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NAME) in different times from 1-33 days. Systolic blood pressure (SBP) was measured by the plethysmographic method; kidneys were isolated to determine the mRNA of COX-2 and renin in the cortex by real-time PCR, and the derived prostanoids COXs renal perfusate were determined by ELISA and plasma angiotensin II was measured by capillary zone

electrophoresis. We found an increase in cortical mRNA for COX-2 and renin from day 2 of treatment with L-NAME. The ultimate expression of mRNA of both enzymes was reached between days 19 to 25; thus, treatment with L-NAME increased renal prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and plasma Ang II in 2 to 19 days. In some rats, blockade of nitric oxide was conducted in conjunction with oral administration of angiotensin converting enzyme by captopril inhibitor (30 mg / kg / day) or specific COX-2: celecoxib (1 mg/kg/day). Captopril prevented the increase in blood pressure effect associated with decreased plasma Ang II derived PGI<sub>2</sub> and increased COX-2. Celecoxib prevented the increase in blood pressure effect associated with decreased plasma prostacyclin and Ang II. These findings suggest that early expression of COX-2 in the kidney leads to increased formation of PGI<sub>2</sub>, which is involved in the regulation of the renin angiotensin induced hypertension during L-NAME.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Los riñones regulan el balance de sodio, de agua corporal y de la presión arterial (Guyton, 1991). El riñón recibe el 20 % del gasto cardíaco, y en los glomérulos el 20% del total del flujo plasmático renal se filtra hacia el espacio de Bowman; el 70 % pasa a través de las arteriolas eferentes, hacia los capilares peritubulares en la corteza renal, y del 5 al 10 % va a la médula. El control renal del agua y de electrolitos, así como de la regulación de la resistencia vascular renal, es crítico para mantener el flujo sanguíneo renal y la función renal. Se trata de un riguroso control del flujo de sangre a través de una intrincada red vascular constituida por las arterias renales segmentarias, las arterias interlobares, las arterias arcuatas y las arterias interlobulares, hasta las arteriolas aferentes y eferentes de la corteza renal y de la vasa recta en la médula (Guyton, 1991).

Para mantener el equilibrio de la sal y del agua, es necesario mantener un control del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular. Esto se logra a través de una serie de mecanismos de control locales, paracrinos, neurales, endocrinos y sistémicos (Loutzenhiser y col., 2006). Por ejemplo, la autorregulación renal se logra en parte a través de un mecanismo miogénico en el músculo liso vascular de los vasos preglomerulares, a través de la detección de los cambios en la tensión de la pared vascular y de esta manera responde en forma apropiada según sea el estímulo. La respuesta puede consistir en vasoconstricción o vasodilatación y permite regular el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular. Las arterias interlobulares y las arteriolas aferentes exhiben esta respuesta miogénica ante cambios en la tensión de la pared vascular. Por ejemplo, cuando la presión arterial aumenta, también se eleva la tensión de la pared, este incremento en la tensión vascular ejercido por el aumento de la presión arterial conduce a la apertura de canales catiónicos del músculo liso vascular que despolariza a la célula. Ello promueve el influjo de calcio y por tanto la contracción de la célula. A diferencia del mecanismo miogénico, la retroalimentación túbulo glomerular responde a variaciones en la composición del

fluido tubular que son detectados por la mácula densa a través del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (NKCC2) como un aumento o disminución en la concentración de NaCl hacia el interior de las células de la mácula densa. Este mecanismo contribuye en forma importante con la regulación de la filtración glomerular y en el control a largo plazo del balance de sodio y del volumen extracelular.

La retroalimentación túbuloglomerular estabiliza la llegada de solutos y fluido a la nefrona distal. En condiciones normales, los cambios en la composición del fluido tubular son registrados por la mácula densa y las señales son transmitidas a la arteriola aferente para regular la carga filtrada. Por ejemplo, cuando la mácula densa, a través del cotransportador NKCC2, sensa un aumento en la concentración de cloruro de sodio (NaCl) tubular, envía una señal (es) para inducir la vasoconstricción arteriolar aferente, que conduce a una disminución del flujo sanguíneo y de la tasa de filtración glomerular, y por lo tanto se reduce la concentración de NaCl filtrado; esto a su vez induce a que se liberen sustancias vasodilatadoras, como las prostaglandinas, en particular la  $\text{PGE}_2$  y la  $\text{PGI}_2$ , para restablecer el tono vascular renal de la arteriola aferente y por otra parte también se liberan vasoconstrictores como la Angiotensina II (Ang II), que actúa en la arteriola eferente para restablecer el tono vascular (Navar y col., 1996).

El ajuste a corto plazo del tono vascular renal implica cambios en la función de la célula endotelial, de la unidad neurohormonal, de las células musculares lisas y la sensibilidad a los estímulos vasoconstrictores (Cain y Khalil, 2002). Mientras que el ajuste a largo plazo involucra cambios estructurales en la pared del vaso sanguíneo como la hipertrofia y cambios en la composición de la matriz extracelular. En la célula endotelial la disminución de sustancias vasodilatadoras principalmente de óxido nítrico (NO) y el aumento de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina 1 y la Ang II, pueden conducir a la disfunción vascular.

El aumento de presión arterial causa remodelado vascular renal y nuevo aumento en la vasoconstricción renal, lo que lleva a un círculo vicioso, por lo que los

aumentos persistentes de la presión arterial conducen al desarrollo de la hipertensión arterial (HTA).

### **1.1. Hipertensión arterial**

La hipertensión arterial es un síndrome cardiovascular progresivo que surge de etiologías complejas e interrelacionadas. Los primeros marcadores del síndrome se presentan antes de que se observe la elevación de la presión arterial, por lo tanto, la hipertensión no puede clasificarse exclusivamente por umbrales discretos de presión arterial. El desarrollo de la hipertensión arterial se asocia fuertemente con anomalías estructurales y funcionales vasculares y cardíacas que dañan el corazón, los riñones, el cerebro, la vasculatura, y otros órganos, llevando a la morbilidad y a la muerte prematura (Giles y col., 2005).

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud 2012, en México se estima que 1 de cada 3 mexicanos adultos padece hipertensión arterial, la mayor prevalencia se encuentra en mujeres y de acuerdo a la edad la mayor prevalencia se encuentra a partir de los 50 años.

En el paciente hipertenso se han propuesto 2 mecanismos que subyacen al desarrollo de la hipertensión arterial: a) la retención de sodio ( $\text{Na}^+$ ), el riñón debe reajustar su relación presión normal-natriuresis a expensas de mayor contracción de las arteriolas eferentes renales, disminuir el flujo sanguíneo renal, aumentar la fracción de filtración e incrementar la retención de  $\text{Na}^+$ , hay un aumento relativo del volumen extracelular no en cantidad absoluta sino en exceso, para el nivel de presión arterial y el volumen del lecho circulatorio. Al incrementar el volumen circulatorio, la resistencia arteriolar se mantiene elevada, por lo que hay mayor esfuerzo cardíaco para impulsar la sangre hacia las arterias, que son sometidas a gran presión, y les ocasiona pérdida de elasticidad. b) También el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) participa en el desarrollo de la HTA

Crowley y col. (2006) mostraron la importancia del SRA en el desarrollo de la hipertensión arterial; la delección de los receptores  $\text{AT}_1$  renales y sistémicos



previenen el desarrollo de la hipertensión arterial tras la infusión de Ang II, o la hipertensión arterial se manifiesta con solo la presencia de los receptores AT<sub>1</sub> renales, lo que sugiere que la Ang II causa la hipertensión principalmente a través de receptores AT<sub>1</sub> expresados en el riñón.

El SRA intrarrenal regula una diversidad de procesos hemodinámicos y renales que contribuyen al equilibrio de sodio y a la homeostasis de la presión arterial. La Ang II, es el péptido más importante que se genera de este sistema, debido a sus acciones sobre la microvasculatura renal, la red tubular y el intersticio. Aunque hay dos subtipos principales de receptores sensibles a la Ang II (AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>), el receptor AT<sub>1</sub> es el principal responsable de las acciones hipertensinogénicas del SRA. La Ang II a través de su unión al receptor AT<sub>1</sub> regula el tono vascular de las arteriolas aferentes y eferentes, el coeficiente de filtración glomerular, también influye sobre la actividad de varios transportadores como el Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Na/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el canal de sodio sensible a amilorida (ENaC) y el cotransportador NKCC2.

La Ang II regula la microvasculatura medular mediante la constricción de la vasa recta (Navar y col., 2008). Debido a sus múltiples acciones la Ang II actúa de manera sinérgica para aumentar la capacidad de los riñones para conservar el sodio y mantener la presión arterial en condiciones de sodio disminuido, durante la pérdida de volumen de fluido extracelular e hipotensión. Cuando se activa inapropiadamente, el SRA intrarrenal conduce a la vasoconstricción y retención excesiva de sodio y agua por lo que se incrementa el volumen circulante total y con ello el incremento de la presión arterial, a largo plazo conduce al desarrollo de la hipertensión dependiente de Ang II.

El papel dominante del SRA en la hipertensión arterial se refleja en el hecho de que su bloqueo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, con los antagonistas del receptor AT<sub>1</sub>, o con el inhibidor de la renina han sido reconocidos como una de las estrategias terapéuticas más eficaces como antihipertensivos.

En ratas hipertensas por coartación aórtica, el tratamiento con inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), como el SC-58236, reduce la actividad

de renina plasmática, y con ello la actividad del sistema renina angiotensina disminuye, indicando que una de las vías de estimulación renal del sistema renina angiotensina es a través de las prostaglandinas derivadas de la COX-2.

## **1.2. Metabolismo del ácido araquidónico**

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado del tipo  $\omega$ -6, constituido por 20 átomos de carbono y cuya oxidación origina pequeños mediadores lipídicos que reciben el nombre de eicosanoides. El AA se sintetiza en el hígado a partir de ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono (en concreto el ácido linoleico y el ácido  $\alpha$ -linolénico) que se absorbe en la dieta a través del intestino, y una vez sintetizado se almacena en la bicapa lipídica de las membranas celulares esterificado en forma de glicerofosfolípidos. En mamíferos, en respuesta a diversos estímulos que dependen del tipo celular, se activan diferentes receptores que activan a su vez varias fosfolipasas, destacando la PLA<sub>2</sub> citosólica como la principal involucrada en la liberación del AA de las membranas celulares (Dennis, 1994). En estado de reposo, la concentración de AA intracelular es muy baja y está controlada principalmente por dos actividades enzimáticas que lo reincorporan a los lípidos de membrana: la araquidonil-CoA sintasa y la araquidonil-CoA transferasa (Irvine, 1982; Murphy, 1989). No obstante, por las características moleculares y en particular por la presencia de cuatro dobles enlaces en posición cis, el AA es susceptible de reaccionar con la molécula de oxígeno. Esto puede ocurrir de manera no enzimática, contribuyendo al estrés oxidativo mediante la formación de isoprostanos, o a través de la acción de tres tipos de oxigenasas: las ciclooxigenasas (COX), que dan lugar a compuestos como las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs), las lipooxigenasas (LOS) que dan lugar a los ácidos hidroxieicosatetranoicos (HETES) y a los leucotrienos (LTs) y las epoxigenasas o citocromos P<sub>450</sub> que originan ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) e isómeros de los HETEs. La preponderancia de las distintas vías depende del tejido en cuestión, ya que la expresión de las diferentes enzimas del metabolismo del AA es específica de tejido.

### **1.2.1 Vía de las ciclooxigenasas**

De entre todas las rutas biosintéticas de eicosanoides, la vía de la COX se considera la más importante, debido al papel principal que desempeñan las PGS en los procesos inflamatorios y su participación en determinadas funciones fisiológicas, como por ejemplo el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, la modulación de la hemodinámica microvascular renal, la liberación de renina, y la reabsorción de agua y sodio.

### **1.2.2. COX-1 y COX-2**

La ciclooxigenasa (COX), también conocida como prostaglandina H sintasa o prostaglandina endoperoxido sintasa, es una enzima bifuncional que unida a la membrana, cataliza el paso limitante en la producción de PGs y tromboxano (TX) (Ohki y col., 1979; Smith y Song, 2002). El término ciclooxigenasa se adoptó en 1974, después de descubrir que la reacción catalizada por esta enzima incluía dos pasos: la ciclación y la oxigenación del AA. En 1976 se purificó la isoforma COX-1 a partir de vesículas seminales ovinas y bovinas (Hemler y Lands, 1976; Miyamoto y col., 1976), y hasta 1988 no se clonó su gen (Yokoyama y Tanabe, 1989). Durante muchos años se pensó que esta isoforma constitutivamente activa era la única ciclooxigenasa existente, hasta que en 1991 dos laboratorios identificaron de forma independiente la COX-2 inducible, a partir de estudios de división celular (Kujubu y col., 1991; Xie y col., 1991).

#### **1.2.2.1. Estructura génica**

Los genes que codifican para la COX-1 y la COX-2 se encuentran en cromosomas diferentes; el de la COX-1 se localiza en el cromosoma 2 en roedores y en el cromosoma 9 en humanos, mientras que el gen de la COX-2 se localiza en el cromosoma 1 tanto en ratones como en humanos (Pairet y Engelhardt, 1996). El gen de la COX-1 está formado por 11 exones y abarca una región de 22 Kb de DNA genómico, que al transcribirse da lugar a un RNAm de 2.8 Kb (Hilla y Neilson, 1992; Yokoyama y Tanabe, 1989). El gen de la COX-2, en cambio está constituido

por 10 exones, que representan 8 Kb de DNA genómico que, por transcripción, origina tres variantes de RNAm de 4.6, 4.0 y 2.8 Kb (Jones y col., 1993; Tanabe y Tohnai, 2002).

En términos generales, el gen de la COX-1 muestra características típicas de los genes *housekeeping* (entre ellas, que no posee TATA box), mientras que la transcripción de la COX-2 depende de distintos factores activados por citocinas y otros mediadores proinflamatorios como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el lipopolisacárido (LPS), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), y el interferón gama (INF $\gamma$ ), inducen a la activación de factores de transcripción que tienen una región consenso en el promotor de la COX-2; entre estos están el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), el complejo de la proteína activadora 1 (AP-1, formado por c-fos y c-jun), C/EBP, son activados por lo que incrementan la transcripción de la COX-2 debido a que hay sitios de unión para todos ellos en la región del promotor de su gen (Simmons y Botting, 2004; Chun y Surh, 2004; Grau y col., 2004). En el extremo 5', el gen de la COX-2 tiene elementos de respuesta a AMP cíclico (AMPc) (sitio CRE), sugiriendo un mecanismo de regulación de la expresión de COX-2 por sus propios productos, ya que uno de los efectos vinculados a los prostanoïdes es el incremento de AMPc (Klein y col., 2007) (Fig 1).

La regulación postranscripcional también es clave en la expresión de COX-2. En el extremo 3' del RNAm de COX-2 se localizan secuencias AUUUA, denominadas secuencias ARE (elemento rico en AU), que regulan la estabilidad. Estas secuencias son reconocidas por proteínas como AUF-1 y HuR (Cok y Acton, 2004; Doller y col., 2007), que modifican la estabilidad y la eficiencia traduccional del RNAm. La MAPK p38 contribuye al incremento de la expresión de COX-2 y aumenta la estabilidad del RNAm y por tanto de su expresión (Dean y col., 1999; Duque y col., 2006; Di mari y col., 2007). Del mismo modo, PI3K y proteína cinasa C (PKC) (Cao y col., 1999) también participan en el incremento de la expresión de COX-2, a través de mecanismos que implican el incremento transcripcional y la estabilización de su RNAm.

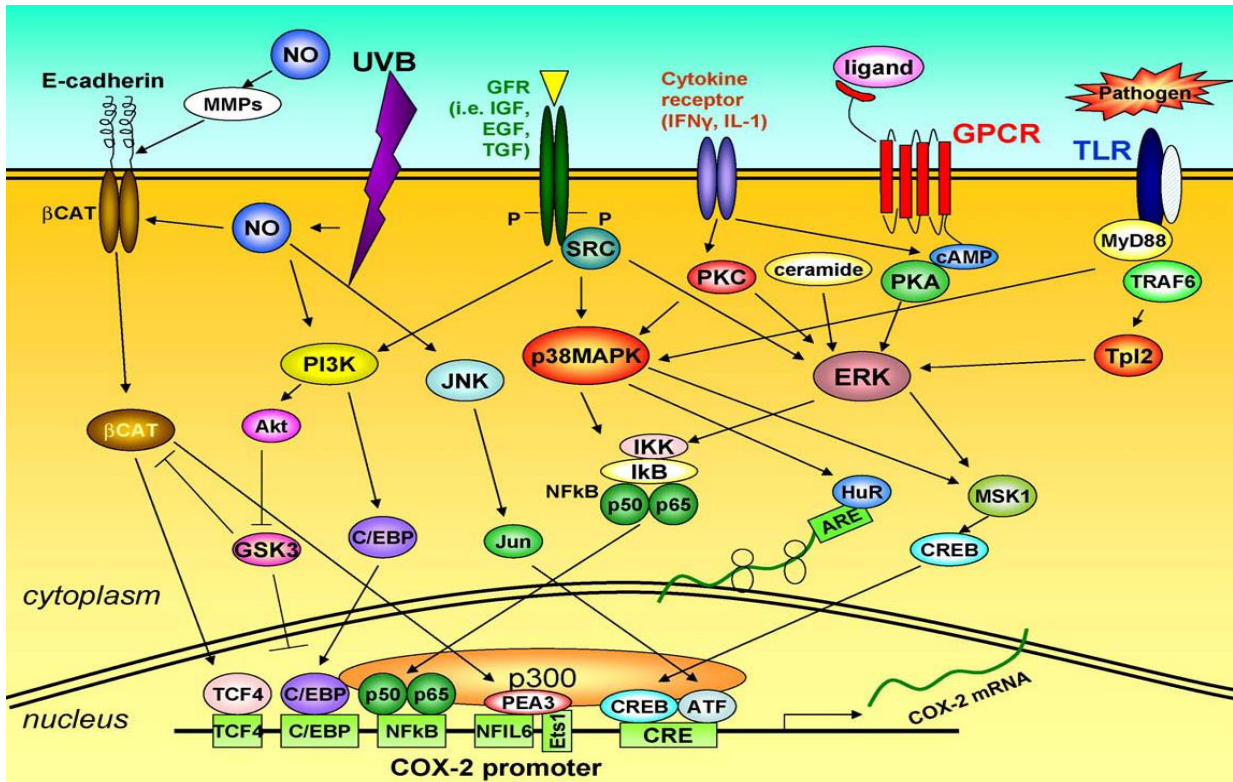


Figura 1. Rutas de señalización que regulan la expresión de COX-2: proteína activadora 1 (AP-1), elemento rico en AU (ARE), proteína de unión a la secuencia enhancer CCAAT (C/EBP), elemento de respuesta al AMPc (CRE); factor de crecimiento epidérmico (EGF), cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), endotelina-1 (ET-1), receptor acoplado a proteínas G (GPR); factor nuclear NFκB (NFκB); proteína cinasa C (PKC); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (tomado de Tsatsanis y col., 2006).

### 1.2.2.2. Estructura proteica

COX-1 y COX-2 son proteínas formadas por dos subunidades glicosiladas que, tras su síntesis, se transportan a la superficie luminal de la membrana nuclear y del retículo endoplásmico donde residen (Spencer y col., 1998).

Ambas enzimas presentan un peso molecular muy similar (de 70 kDa), a pesar de que sus proteínas no son tan semejantes, conservan tan sólo un 60% de homología en sus aminoácidos. Aunque las dos isoformas catalizan reacciones idénticas y muestran las mismas constantes cinéticas para la conversión del AA en prostanoïdes, el centro activo de la COX-1 es más pequeño que el de la COX-2, lo cual puede permitir a la COX-2 una mayor selectividad de sustratos diferentes al AA; por ejemplo, COX-2 es más eficiente que COX-1 con el 2-araquidonilglicerol, la anandamida y los ácidos grasos  $\omega$ -3, como el eicosapentaenoico (EPA) (Kozak y col., 2000).

Cada cadena polipeptídica de la COX está organizada en cuatro dominios estructurales: tras el péptido señal que marcaría al polipéptido para ser translocado a la membrana, en la región amino-terminal, existen dominios con posibilidad de formar puentes de disulfuro, que constituyen el dominio de dimerización.

A continuación encontramos un dominio formado por hélices  $\alpha$  de carácter anfipático. Finalmente, el dominio de mayor tamaño posee una estructura globular donde se sitúa el dominio catalítico, formado por una estructura de hélices  $\alpha$ ; este dominio forma dos lóbulos en la cara interna, en los cuales se localiza el grupo hemo necesario para la actividad de peroxidasa. El dímero se forma por la interacción de dos dominios de dimerización de cada monómero, de forma que queda un canal hidrofóbico de acceso a los dominios catalíticos. A este canal no solo tienen acceso los sustratos lipídicos, sino también los antiinflamatorios no esteroïdales (AINES). En el canal de acceso de la COX-1 se encuentran algunos residuos de aminoácidos implicados en la actividad enzimática, como la tirosina

385 en COX-1 y tirosina 371 en COX-2 que junto con el glutamato 524 son los residuos iónicos del canal (Garavito y DeWitt, 1999).

### **1.2.2.3. Reacciones catalizadas por las ciclooxigenasas**

El primer paso en la formación de PGs es la liberación del AA de los fosfolípidos unidos a membrana, normalmente por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) citósolica. Una vez liberado, tanto COX-1 como COX-2 lo transforman en PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> por idénticas reacciones: de hecho la COX es una enzima dual que añade dos moléculas de oxígeno al AA para formar PGG<sub>2</sub> y después reduce a este hidroperóxido cíclico en el endopéroxido altamente activo PGH<sub>2</sub> (Ohki y col., 1979; Smith y Song, 2002), que actúa como sustrato intermedio para la síntesis de PGs de las series E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> e I<sub>2</sub>.

El hecho de que la PGH<sub>2</sub> se transforme en un metabolito o en otro está regulado de forma específica, dependiendo del tipo celular y de las sintasas que éste exprese, de tal manera que cualquier célula formadora de prostanoídes, sintetiza uno de ellos mayoritariamente. Por ejemplo, la PGH<sub>2</sub> se transforma en PD<sub>2</sub> en el cerebro y en mastocitos por la sintasa de PGD citosólica. Alternativamente, la PGH<sub>2</sub> puede convertirse en PGF<sub>2α</sub> por la sintasa de PGF, que se expresa principalmente en el útero. Las células endoteliales vasculares producen PGI<sub>2</sub> o prostaciclina a partir de la PGH<sub>2</sub> mediante la sintasa de PGI<sub>2</sub>, y las plaquetas liberan TXA<sub>2</sub> tienen una vida media muy corta (30 segundos y 3 minutos, respectivamente) y rápidamente son hidrolizados a los compuestos inactivos 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> y TXB<sub>2</sub>.

Finalmente, PGE<sub>2</sub> se produce en muchos tipos celulares mediante la PGE sintasa en mamíferos existe bajo tres isoformas diferentes: sintasa de PGE microsomal 1 (PGE-1m), sintasa de prostaglandina E-1 citosólica (PGES-1c) y la sintasa de prostaglandina E-2 membranal (PGES-2m). La sintasa de prostaglandina E-1 membranal se identificó y se caracterizó en 1999 por Jakobsson y col., como miembro de la superfamilia de proteínas asociadas a membrana e involucradas en el metabolismo de eicosanoides y de glutatión, y con capacidad de catalizar la

conversión de PGH<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub>. Más tarde se clonó la PGES-1c de la PGE sintasa expresada de forma ubicua, que también isomeriza PGH<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub>, específicamente en presencia de glutatión (Murakami y Kudo, 2004; Tanioka y col., 2000). Finalmente, en el año 2002 se identificó una segunda isoforma de la sintasa de PGE asociada a membrana, la PGES-2m (Tanikawa y col., 2002). De entre las tres isoformas, la PGES-1m es la que ha recibido mayor atención porque esta enzima es inducible y se encuentra funcionalmente ligada a la COX-2 (Mancini y col., 2001; Murakami y Kudo, 2004).

#### **1.2.2.4. Expresión de COX-1 y COX-2**

Las diferencias más notables entre COX-1 y COX-2 se aprecian en su expresión y distribución tisular, así como en su función celular y fisiológica. Así, la COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos de las diferentes especies animales, incluyendo el sistema gastrointestinal (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon), hígado, riñón, musculatura lisa vascular y plaquetas (Kargaman y col., 1996; Morta, 2002). En general, la actividad de esta isoforma ha sido relacionada con las funciones homeostáticas de las PGs, como la citoprotección de la mucosa gátrica y el mantenimiento de la función plaquetaria y de la perfusión renal. La COX-2, en cambio, en situaciones normales es indetectable en la mayoría de los tejidos y células (excepto en el riñón, placenta, cerebro y en plaquetas de nueva formación, en los que hay una expresión constitutiva), pero aumenta su expresión en respuesta a estímulos proinflamatorios. Debido a ello se ha identificado a esta isoforma como la que posee expresión inducible, y la que sintetiza las PGs involucradas en procesos de inflamación, mientras que las PGs derivadas de la COX-1 se han considerado responsables de preservar las funciones fisiológicas.



### **1.2.2.5. COX-3**

La existencia de sólo dos isoformas de la COX (COX-1 y COX-2) no podía explicar las acciones analgésicas y antipiréticas del acetaminofeno (paracetamol). Este compuesto a menudo se clasifica como un AINE, a pesar de que en la práctica clínica y en modelos animales se había visto que poseía una muy baja actividad antiinflamatoria (Botting, 2000). Ya que en 1972, Flower y Vane habían demostrado que el paracetamol inhibía con mayor intensidad la actividad COX en homogenados de cerebro de perro que en homogenados de bazo. Esto hizo pensar que existían variantes de la COX con diferente sensibilidad al paracetamol, y que, dado que ni COX-1 ni COX-2 eran estos candidatos, debía haber otra isoenzima sobre el que estuviera actuando el acetaminofeno. No fue hasta el año 2002 que Daniel y Simmons describieron la existencia de la COX-3 en la corteza cerebral canina, posteriormente Chandrasekharan y col. (2002), mostraron que por Splicing alternativo, el gen de COX-1 genera diferentes variantes de RNAm: COX-3, COX-2 y dos COX-1 parciales llamadas proteínas pCOX-1 pero manteniendo el intrón 1; esto supone que, a nivel de proteína, COX-3 presenta una inserción de 30-34 aa dentro del péptido señal hidrofóbico.

### **1.2.3. Actividad biológica de los eicosanoides derivados de las ciclooxigenasas**

#### **1.2.3.1. Productos de la vía de la ciclooxigenasa**

En la década de 1930, las PGs fueron aisladas por primera vez a partir de muestras de semen, próstata y vesículas seminales, destacándose su capacidad para disminuir la presión arterial y producir contractilidad de la musculatura lisa (Goldblatt, 1933; Von Euler, 1935).

Treinta años después Bergstrom y Samuelsson establecieron la estructura de las dos primeras PGs que se llamaron PGE y PGF por su respectiva distribución en éter y buffer de fosfatos, demostrando además que se producían a partir del AA (Bergstrom y col., 1964). En la actualidad el nombre de prostaglandinas abarca

diez grupos moleculares específicos, designados por las letras de la A a la J, que se diferencian entre ellos por el grupo funcional que se encuentra en las posiciones 9 y 11 del anillo ciclopentano (Hecker y col., 1995). Cada grupo de PGs está formado por tres series designados por los números 1, 2 y 3 en forma de subíndice, dependiendo del precursor del que derivan: ácido di-homo-linoleico, AA o EPA. Entre las PGs, las más ampliamente distribuidas y estudiadas son las que derivan del AA (PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>). En cuanto a la PGF, el subíndice adicional α o β hace referencia a la configuración espacial del grupo hidroxilo del carbono 9.

### **1.2.3.2. COX y el riñón**

#### **1.2.3.2.1. Distribución de la COX-1 / COX-2 y de sus metabolitos**

A través de técnicas como la reacción de la polimerasa en cadena de tiempo real (RT-PCR), Western Blot e inmunohistoquímica se ha identificado que la COX-1 se expresa en el riñón en el endotelio arteriolar, glomérulo (células mesangiales y cápsula de Bowman), túbulo contorneado distal (TCD), y túbulo conector (TCN) (Harris y col., 1994) (Figura 1). Por el contrario, la COX-2 se encuentra en la mácula densa (MD), en la porción ascendente gruesa del asa de Henle (TAL), en la vasa recta y arteriola aferente (Harris y Breyer, 2001) (Fig 2).

#### **1.2.3.2.2. Sintetasas de prostaglandinas**

La PGH<sub>2</sub> es el producto del metabolismo del araquidónico mediado por las ciclooxigenasas, se metaboliza por las diferentes sintetasas de prostaglandinas a varios productos distintos. Las sintetasas de prostaglandinas como la sintasa de prostaglandina E (PGES), la sintasa de prostaciclina (PGIS), la sintasa de PGD (PGDS), la sintasa de PGF (PGFS) y la sintasa de tromboxano (TXAS), son las responsables de sintetizar la PGE<sub>2</sub>, la PGI<sub>2</sub>, la PGD<sub>2</sub>, la PGF<sub>2α</sub>, y el TxA<sub>2</sub>, respectivamente (Dulin y col., 1998).

La expresión de la PGESm-1 es inducida por citocinas y estímulos inflamatorios (Ward y col., 2004) mientras que la expresión de la PGESc y PGESm-2 son constitutivas (Ward y col., 2004). La sintasa de prostaglandina D (PGDs) cataliza la síntesis de PGD<sub>2</sub> a partir de la PGH<sub>2</sub> (Guan y col., 1997). Dos tipos de sintasas de PGD se han caracterizado, la sintasa de PGD de tipo lipocalina y la hematopoyética. La PGF<sub>2α</sub> también puede ser sintetizada a partir de la PGH<sub>2</sub> a través de la 9,11 endoperóxido reductasa (Kujubu y col., 1997) o de la PGE<sub>2</sub> por la cetorreductasa (Smith y col., 2001). La distribución de las diferentes sintasas de prostaglandinas en el riñón es la siguiente: la PGESm-1 se encuentra en la mácula densa, células intersticiales medulares, conducto colector y porción ascendente gruesa del asa de Henle. La TXAS se encuentra en el glomérulo y células intersticiales medulares (Breyer y Breyer, 2000). La PGIS se localiza en las células intersticiales medulares, mácula densa y vasa recta (Fig 2).

#### **1.2.3.2.3. Receptores de prostaglandinas**

Los receptores de las prostaglandinas se encuentran acoplados a proteínas G (Narumiya y Fitzgerald, 2001). Dentro de los cuales se encuentran: los receptores para la PGD (DP), los receptores para la prostaglandina E (EP), los receptores para la prostaglandina F (FP), los receptores para la prostaciclina (IP) y los receptores para el tromboxano (TP), cada uno se une selectivamente con la PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, o TxA<sub>2</sub>, respectivamente (Narumiya y Fitzgerald, 2001). Cuatro subtipos de receptores EP han sido identificados: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> (Narumiya y Fitzgerald, 2001). El receptor TP es un potente activador de la agregación plaquetaria y vasoconstrictor potente del músculo liso. Por el contrario, el receptor de IP tiene un efecto antitrombótico.

Los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> son vasoconstrictores del músculo liso, mientras que los receptores EP<sub>2</sub> o EP<sub>4</sub>, y el receptor IP son potentes vasodilatadores del músculo liso.

Los diversos efectos de estas prostaglandinas se derivan de las diferentes células en las que estos receptores se expresan, así como las diversas vías de

señalización que median sus efectos. Cada receptor de los prostanoïdes activa una vía de señalización acoplada a una proteína distinta. Los receptores IP, DP, EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> están acoplados a la proteína G (Gs) y al incremento de los niveles de AMPc intracelular, mientras que los receptores FP, EP<sub>1</sub> y los receptores TP inducen la movilización de calcio intracelular (Narumiya y Fitzgerald, 2001).

El receptor EP<sub>3</sub> se acopla a la proteína G (Gi) y reduce la síntesis de AMPc (Narumiya y Fitzgerald, 2001). La localización intrarrenal de los receptores de prostanoïdes y las consecuencias de su activación se han caracterizado sólo parcialmente (Breyer y Breyer, 2000).

La expresión del receptor EP<sub>1</sub> predomina en el conducto colector (Guan y col., 1998). La activación del receptor EP<sub>1</sub> aumenta los niveles de calcio intracelular e inhibe la reabsorción de sodio y agua en el conducto colector (Guan y col., 1998), lo que sugiere un efecto natriurético para el receptor EP<sub>1</sub>. Sin embargo, estudios realizados *in vivo* en ratones con delección del receptor EP<sub>1</sub> han mostrado incremento en los niveles plasmáticos de renina y de la presión arterial (Stock y col., 2001); estudios recientes muestran que el receptor EP<sub>1</sub> facilita la acción vasoconstrictora de Ang II (Guan y col., 2007).

La expresión del receptor EP<sub>3</sub> se ha detectado en la porción ascendente gruesa del asa de Henle y en el conducto colector (Fleming y col., 1998). Se ha demostrado que la administración de indometacina aumenta la osmolalidad urinaria en ratones normales; sin embargo, la delección del receptor EP<sub>3</sub> no muestra aumento de la osmolalidad urinaria (Fleming y col., 1998), lo que sugiere que el receptor EP<sub>3</sub> está implicado en la capacidad de concentración de la orina inducida por la indometacina.

El receptor FP se localiza en el túbulo contorneado distal y en el conducto colector; en estos segmentos de la nefrona puede inhibir la absorción renal de agua y de sal (Saito y col., 2003). Aunque sólo niveles bajos de expresión del receptor de EP<sub>2</sub> se detectan en el riñón, ratones con delección del receptor EP<sub>2</sub> muestran sensibilidad a la sal, lo que sugiere que este receptor puede

desempeñar un papel importante en la excreción de la sal (Kennedy y col., 1999). En contraste, la expresión del receptor EP<sub>4</sub> predomina en el glomérulo, con lo cual puede contribuir a la regulación de la hemodinámica glomerular (Narumiya y Fitzgerald, 2001) (Fig 2).

La expresión del receptor IP se encuentra en la arteriola aferente, donde puede estimular la vasodilatación de las arteriolas renales y estimular la liberación de renina (Breyer y Breyer, 2000). Los receptores TP también se localizan en el glomérulo, por lo que sus efectos son principalmente vasoconstrictores sobre los capilares glomerulares, acompañados por una tasa de filtración glomerular reducida. La presencia del receptor TP en el glomérulo puede contrarrestar los efectos de los prostanoïdes vasodilatadores como la PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> y de esta manera puede aumentar la resistencia glomerular (Narumiya y Fitzgerald, 2001).

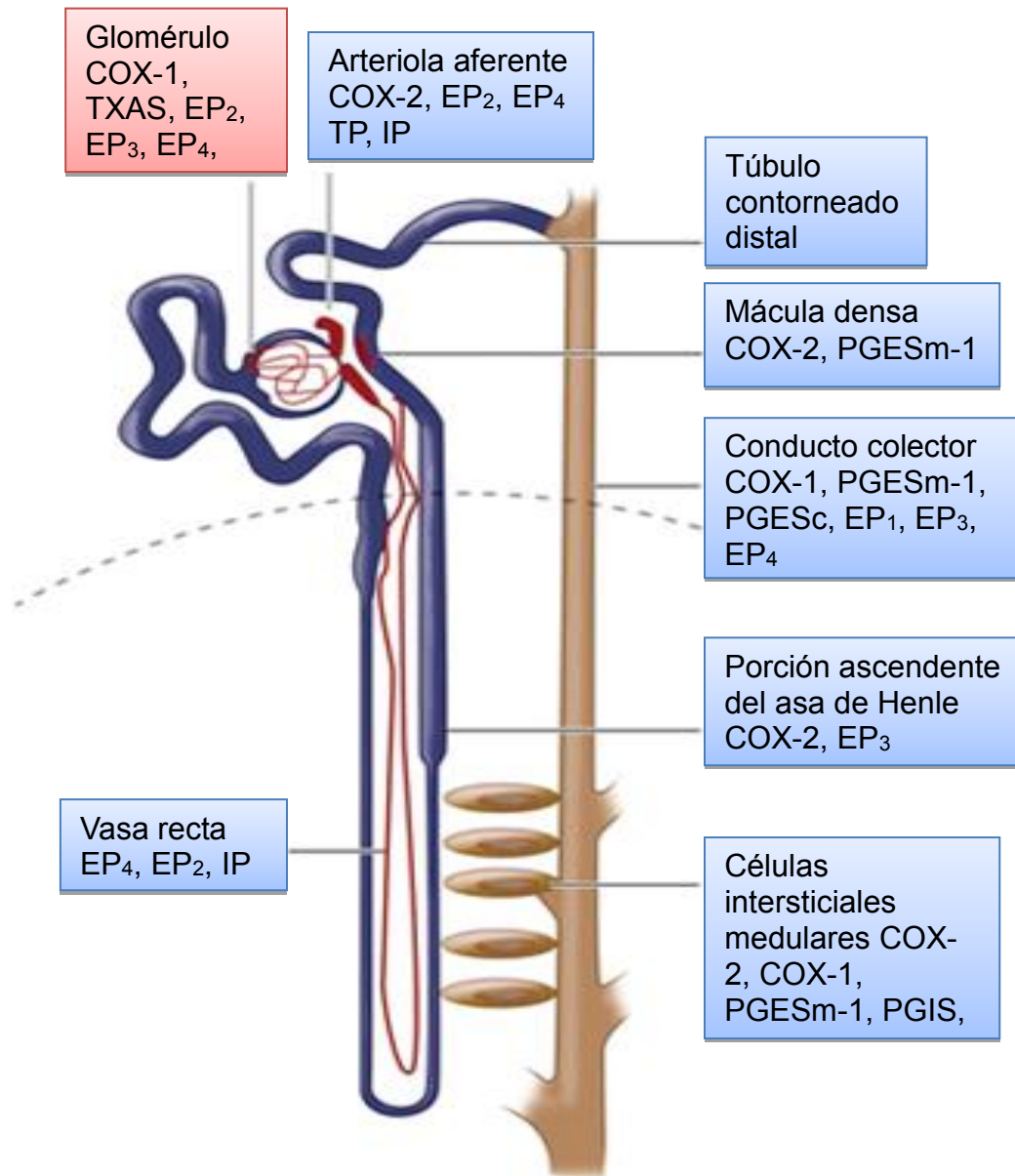


Figura 2. Localización de la expresión de las ciclooxygenasas, de las sintasas de prostaglandinas, y de los receptores de los prostanoideos en la nefrona (tomado de Hao y Breyer, 2008). Sintasa de prostaglandina E microsomal-1 (PGESm-1), sintasa de prostaciclina (PGIS), sintasa de tromboxano (TXAS), sintasa de prostaglandina E citósolica (PGESc).

#### **1.2.4. Acciones biológicas de los prostanoideos**

La activación de los receptores de prostanoideos dispara diferentes procesos celulares en los distintos tejidos. Dada la gran variedad de acciones que ejercen estos metabolitos, a continuación sólo se comentarán brevemente aquellas actividades más relevantes de las PGs, y que tienen lugar en el tracto gastrointestinal, en el sistema cardiovascular, en el sistema respiratorio y renal, en el SNC y periférico y los órganos reproductores.

En el tracto gastrointestinal se ha descrito un papel citoprotector de las PGs y modulador de las secreciones y motilidad gástrica (Clária, 2003).

En el sistema cardiovascular la acción de los prostanoideos se centra sobre todo en las células musculares lisas y plaquetas, donde la PGI<sub>2</sub> presenta acciones contrarias a las del TXA<sub>2</sub>. Así, en la vasculatura y concretamente en las venas, la PGI<sub>2</sub> promueve principalmente la vasodilatación, mientras que el TXA<sub>2</sub> actúa como vasoconstrictor (Hecker y col., 1995). Por otro lado, en cuanto a la agregación plaquetaria, el TXA<sub>2</sub> la induce mientras que la PGI<sub>2</sub> la inhibe.

En cuanto al tracto respiratorio, se ha detectado expresión constitutiva de la COX-2 que se ha asociado al control del flujo de sangre pulmonar (Ermer y col., 1998). Además, se ha comprobado que las PGs presentan acciones sobre el tono bronquial y el diámetro de los vasos sanguíneos pulmonares (Warner y Mitchell, 2004).

En el SNC y periférico se ha descrito expresión constitutiva de la COX-2, y se ha asociado entre otras funciones a la percepción y transmisión del dolor. De ahí que la acción analgésica de los antiinflamatorios puede explicarse por ambas acciones: inhibición de la producción de metabolitos de la COX-2 en el SNC y localmente (Khan y col., 2002).

En el sistema reproductor, se sabe que los prostanoideos son importantes para inducir las contracciones uterinas durante el parto, así como en el proceso de ovulación (DuBois y col., 1998).

### **1.2.5. Acciones biológicas de los productos de la COX en el riñón**

Debido a su rápida degradación, las acciones biológicas de las PGs se producen en el propio lugar de síntesis. Así, las PGs sintetizadas en arterias y en el glomérulo se considera que regulan la perfusión renal y la tasa de filtración glomerular, y las producidas por las células del túbulo están involucradas en el mantenimiento de la concentración de sodio y agua.

#### **Efectos en la hemodinámica renal**

A pesar de que tanto la PGE<sub>2</sub> como la PGI<sub>2</sub> son potentes vasodilatadores renales (Bolger y col., 1978; Edwards, 1985), en condiciones normales, la contribución de estos productos en la regulación del tono vascular renal es mínima. De hecho, en diferentes trabajos se ha demostrado que la inhibición de la COX no induce ningún cambio en la hemodinámica renal en personas sanas (Ros y col., 1995). Sin embargo, las PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> son cruciales en el mantenimiento de la función renal en circunstancias en las que se presentan desequilibrios en el volumen sanguíneo efectivo arterial como, por ejemplo, en situaciones de dietas bajas en sodio, hipovolemia hemorrágica y condiciones edematosas asociadas a fallo congestivo. En estas situaciones patológicas, los sistemas vasoconstrictores endógenos como el sistema renina angiotensina, el sistema nervioso simpático y la hormona antidiurética se encuentran sobreactivados y las PGs actúan antagonizando los efectos vasoconstrictores de estos compuestos vasoactivos, con la finalidad de preservar la perfusión renal.

#### **Efectos en el transporte de agua y sal**

Las PGs están claramente involucradas en el transporte renal de sal y agua, mediante la inhibición de la reabsorción de sodio en las células tubulares epiteliales. En el túbulo colector, tanto de ratas como de humanos, es donde se ha detectado un mayor marcaje de la proteína de la COX y es la principal fuente de PGs a lo largo de la nefrona, siendo la PGE<sub>2</sub> la más abundante (Mattix, 2000). En el túbulo colector hay un elevado número de receptores de PGs de diferentes



tipos, es en este segmento donde el transporte de sodio y solutos está fuertemente regulado por los productos de la COX. Por otro lado, el túbulo proximal y el asa de Henle presentan una limitada capacidad de generar metabolitos de la COX (Bonvalet y col., 1987; Farman y col., 1987). En cuanto a la rama ascendente gruesa del asa de Henle, dos grupos han identificado en el riñón de rata la expresión de la COX-2 en un subgrupo de células tubulares de este segmento, en estas células también expresan la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>- ATPasa, marcador molecular de células tubulares distales, por lo que los autores concluyeron que la COX-2 participa en el mantenimiento del equilibrio iónico a lo largo del túbulo renal (Harris y col., 1994; Vio y col., 1997).

### **Funciones de la COX-2 en la médula renal**

La médula renal es uno de los sitios más importantes de la expresión de la COX-1 y de la COX-2 y de la síntesis de prostaglandinas (Guan y col., 1997). La COX-1 y la COX-2 muestran compartimentalización diferencial dentro de la médula, la COX-1 predomina en el conducto colector medular y la COX-2 predomina en las células intersticiales medulares y en las células endoteliales de la vasa recta (Hao y col., 2000).

La inducción de la expresión de la COX-2 en la médula está sujeta a respuestas de estrés fisiológico como la privación de agua y los lipopolisacáridos (Yang y col., 1999). Después de la deshidratación, se ha observado que en las células intersticiales se induce un incremento de la expresión del RNAm y de la proteína de la COX-2 (Hao y col., 2000); otro estímulo que induce la expresión de la COX-2 en la médula es el estrés hipertónico, así se ha mostrado que en cultivos de células intersticiales medulares sometidas a diferentes concentraciones de NaCl, concentraciones elevadas de NaCl inducen la expresión de COX-2 en medios de cultivo hipertónicos (usando NaCl o manitol), lo que sugiere que cambios en el volumen celular son críticos para los efectos de la tonicidad sobre la expresión de la COX-2 expresión.

La expresión de la COX-2 está regulada por varios procesos que alteran su transcripción, la estabilidad del RNAm y la eficiencia de traducción del mensaje (Dixon y col., 2000). La transcripción de la COX-2 está regulada por una variedad de citocinas y factores de crecimiento, incluyendo el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Yamamoto y col., 1995), la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (He y col., 1995). Estos efectos están mediados, en parte, por la activación coordinada de varios factores de transcripción que se unen y activan la secuencia consenso en la región 5' del gen de la COX-2, dentro de estos factores de transcripción se encuentran: el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), IL-6-C/EBP, y un elemento de respuesta al AMPc (CRE). Por ejemplo, la estimulación del factor de crecimiento derivado de plaquetas, activa al JNK, la unión de heterodímeros fos/jun a la secuencia consenso CRE que a su vez induce la transcripción del gen de la COX-2 (Xie y Herschman, 1996).

La exposición de las células intersticiales medulares a condiciones hipertónicas, ha mostrado aumentar la unión de la subunidad p65 y p50 del NF $\kappa$ B presente en el promotor de la COX -2 (Hao y col., 2000).

La inhibición del NF $\kappa$ B disminuye marcadamente la expresión del RNAm de la COX - 2 ante un estrés hipertónico. Otros estudios sugieren que las MAP cinasas y el JNK contribuyen a la inducción hipertónica de la COX-2 (Yang y col., 2000). La privación de agua se asocia con la activación de varias cinasas entre ellas se encuentran: JNK, ERK y la MAP cinasa p38, en la médula renal (Wojtaszek y col., 1998).

Los prostanoides derivados de la COX-2 desempeñan un papel crítico en el mantenimiento del flujo sanguíneo renal medular, en la excreción renal de sodio, y en la presión arterial sistémica. Cultivos celulares de células intersticiales medulares han mostrado que principalmente se sintetiza PGE<sub>2</sub> (Hao y col., 1999), cuya función principal es la de vasodilatar la vasa recta, contrarrestando de esta manera el efecto constrictor de la Ang II o de endotelina 1 y de ese modo ayuda a mantener el flujo sanguíneo medular renal (Xie y Herschman, 1996).

Estudios recientes en ratones a los que se les administró un inhibidor selectivo de la COX-2 como el SC - 58236, mostraron una reducción significativa del flujo de sangre medular renal, mientras que los inhibidores selectivos COX-1 no mostraron algún efecto significativo (Komhoff, 2000). La regulación del flujo sanguíneo medular renal tiene implicaciones importantes en la regulación de la sal y de la presión arterial sistémica (Cowley y Franz, 1994). La reducción del flujo sanguíneo medular aumenta la presión intersticial de la reabsorción renal de sal (Cowley, 1994). Las prostaglandinas pueden modular la reabsorción de sodio y agua no sólo a través de los efectos hemodinámicos, sino también a través de ejercer efectos directos sobre la reabsorción de sodio epitelial por la porción ascendente gruesa del asa de Henle y el conducto colector (Breyer y Breyer, 2000).

La pérdida del efecto inhibidor tónico de la PGE<sub>2</sub> derivada de la COX-2 sobre la reabsorción de sal por estos segmentos pueden contribuir a la retención de sodio observado tras la administración de inhibidores selectivos de la COX-2 (Brater, 1999). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la inhibición de la COX-2 en la médula renal no sólo puede comprometer el flujo sanguíneo medular, si no también puede poner en riesgo directamente la viabilidad celular intersticial medular.

El uso a largo plazo de los AINEs que inhiben las COXs se ha asociado con necrosis papilar, deterioro estructural y funcional renal progresivo (Bach y Nguyen, 1998). El daño renal inducido por los AINEs ocurre en casos de deshidratación, lo que sugiere una dependencia crítica de las prostaglandinas en el funcionamiento renal ante una deshidratación (Schlondorff, 1993).

### 1.2.6. Regulación de la expresión de la ciclooxygenas-2 en la mácula densa

La mácula densa es una región especializada de 15–20 células formada por una membrana basal cubierta por pequeñas prolongaciones llamados cilios que se encuentran en contacto con la velocidad del fluido luminal que llega a la mácula y una membrana apical cuya función es la de sensor la concentración de NaCl que llega a la mácula densa y lo realiza a través del cotransportador NKCC2 (Oppermann y col., 2006).

El NKCC2 tiene una gran afinidad por el Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, y menor afinidad para el Cl<sup>-</sup> con lo cual resulta en un mecanismo de absorción que es muy sensible a cualquier cambio en el cloruro luminal y un tercer grupo de células similares a las mesangiales que aparecen entre el glomérulo y la mácula densa llamadas células lacis aparecen dentro de un espacio de forma triangular, abierto por arriba, cuyos lados son la mácula densa en su cara basal y las arteriola aferente y eferente en su cara lateral, están por tanto, en estrecho contacto con el resto de las formaciones del aparato yuxtglomerular y con las células mesangiales intercapilares del glomérulo, de ahí que también se llame mesangio extraglomerular. Estas células poseen finas prolongaciones que originan entre ellas un entramado o lacis, rodeado de una matriz extracelular amorfa (Schnermann, 2001).

Existen diferentes estímulos que pueden inducir a un aumento en la expresión de la COX-2 en la mácula densa dentro de los cuales se encuentran: la administración de diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y la administración de bloqueadores del receptor AT<sub>1</sub>.

**Administración de diuréticos:** La concentración de NaCl que llega a la mácula densa influye en el estado de contracción de la arteriola aferente, así como en la expresión de la COX-2 y en la liberación de renina. Estas observaciones son apoyadas a partir del bloqueo farmacológico del NKCC2 con diuréticos, como la acetazolamida, que inhibe la actividad de la anhidrasa carbónica en el túbulo

proximal, por lo que la concentración de NaCl que llega a la mácula densa aumenta, esto a su vez induce a que se inhiba la expresión de la COX-2 y la liberación de renina, mientras que la hidroclorotiazida, la amilorida, la furosemida y la espironolactona inhiben la reabsorción en el túbulo contorneado distal, por lo que la mácula densa sensa una caída en la concentración de NaCl (Zhang y col., 2005); efecto observado también cuando disminuye la autorregulación de la tasa de filtración glomerular (85 mmHg), esta caída es sensada por el barorreceptor intrarrenal localizado en la arteriola aferente, que envía la señal hacia la mácula densa; estas células son sometidas a un estrés hiposmótico, por lo que se inicia la fosforilación rápida de las MAP cinasas p38 y ERK1/2 y a través del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) se induce la expresión de la COX-2 (Cheng y Harris, 2002), y a través de la síntesis de prostanoïdes vasodilatadores, en particular la PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub>, causan vasodilatación de la arteriola aferente y estimulación de la liberación de renina (Harris y col., 1994).

### **Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.**

La administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina como el captopril, trae consigo que otros péptidos como la bradiginina no sean degradados.

La bradiginina, cuando se une a su receptor B<sub>2</sub>, induce la liberación del óxido nítrico (NO) y se produce vasodilatación, pero cuando se deja de producir NO a través de la administración de análogos de L-arginina como el L-NAME esta vía se inhibe y comienza a entrar mayor cantidad de calcio a la célula endotelial, por lo que se incrementa la concentración intracelular lo cual activa la fosfolipasa A<sub>2</sub> que libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y sirve como sustrato para la COX-2, principalmente para sintetizar prostanoïdes vasodilatadores (Gryglewski y col., 2005).

**Bloqueo del receptor AT<sub>1</sub>:** La activación del receptor AT<sub>1</sub> en la MD inhibe la expresión de la COX-2. Zhang y col., (2005), propusieron que esto puede reflejar la capacidad de Ang II para regular la actividad del cotransportador NKCC2. Posteriormente, estudios realizados por Cristobal y col., (2009) mostraron que la Ang II ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la expresión de la COX-2, este efecto es debido a que la Ang II a través de su unión al receptor AT<sub>1</sub>, activa una serie de cinasas dependientes de serina/treonina llamadas WNK y en particular la WNK3 o WNK4 fosforila y activa a otra cinasa llamada SPAK (cinasa de serina treonina rica en alanina relacionada con STE20/SPS1), esta cinasa fosforila las treoninas 96, 101 y 111 contenidas en el NKCC2, lo que induce a que se incremente la concentración de NaCl en la mácula densa, inhibiendo de esta manera la expresión de la COX-2.

#### **1.2.7. Mecanismos de liberación de renina**

El aparato yuxtaglomerular es una región de contacto especializado entre el glomérulo y la porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical que desempeña un papel activo en el mantenimiento de la homeostasis iónica, en el control de la presión arterial y en la liberación de renina (Yao y col., 2009). El aparato yuxtaglomerular consta de un componente tubular, la mácula densa, y un componente vascular que consiste en las arteriolas aferentes y eferentes, así como de un mesangio extraglomerular.

El aparato yuxtaglomerular se encuentra formado por varios tipos de células como las células del músculo liso vascular, células endoteliales, células mesangiales, células de la mácula densa, y células granulares yuxtaglomerulares secretoras de renina (Fig 3).

De estas células, las células de la mácula densa y las células endoteliales actúan como sensores que perciben cambios en la concentración de Na<sup>+</sup> y la presión arterial, respectivamente, enviando señales a las células efectoras (células musculares lisas y células secretoras de renina) en la arteriola aferente, y de esta manera regulan el tono vascular preglomerular y la secreción de renina. Para el

mantenimiento de la estructura y función del aparato yuxtaglomerular se requiere de la coordinación de la comunicación intercelular, mediada por neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas que tienen efecto autocrino y paracrino. La comunicación directa de célula a célula a través de uniones estrechas ha sido reconocida como un mecanismo importante en la regulación de la función renal, las uniones estrechas son canales intercelulares que permiten el intercambio directo de pequeñas moléculas como iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ) y metabolitos de bajo peso molecular como nucleótidos cíclicos e inositol 1, 4,5-trifosfato (Goodenough y col., 1996; Evans y col., 2002)

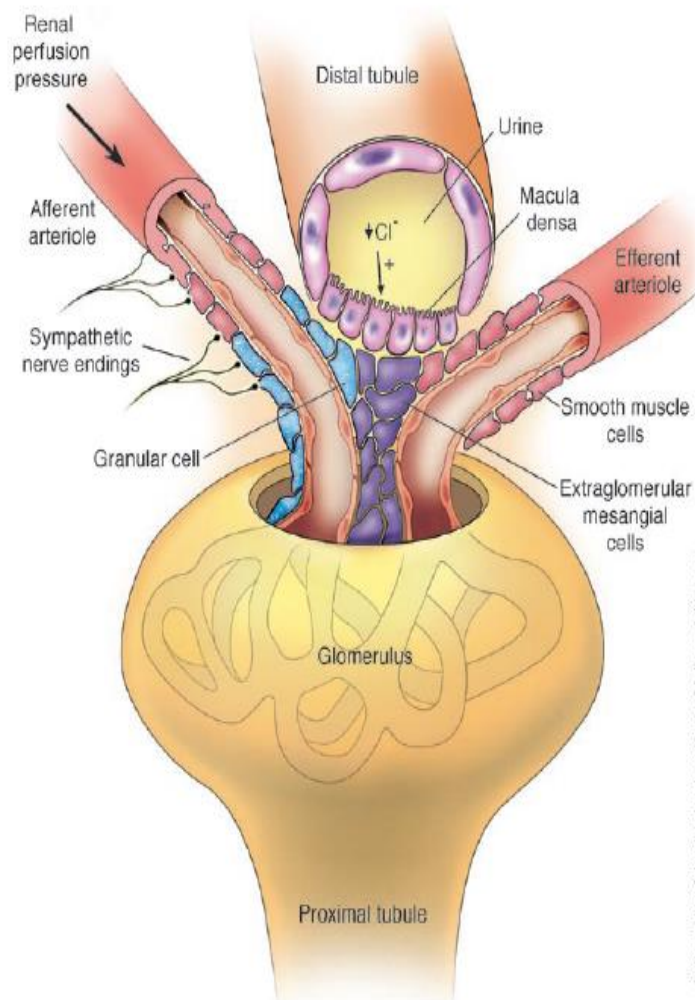


Figura 3. Estructura del aparato yuxtaglomerular (Tomado de Yao y col., 2009).

La renina se expresa normalmente en las células yuxtaglomerulares, que son células semejantes a las células del músculo liso granular en la arteriola aferente. Menores cantidades de expresión de renina se reportan en la arteriola eferente y el glomérulo, y recientes estudios muestran que la renina se expresa en el segmento conector y conducto colector. Sin embargo, por mucho la mayor expresión de renina ocurre en las células yuxtaglomerulares. La secreción de renina es mediada por diversos estímulos, incluyendo la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, alteraciones en la presión de perfusión arteriolar y regulación mediada por la mácula densa (Navar y col., 2000).

Existen tres mecanismos generales que pueden inducir la liberación de renina de las células yuxtaglomerulares, dos de ellos son intrarrenales y están formados por el barorreceptor intrarrenal y la mácula densa a través de las prostaglandinas; un tercer mecanismo es de origen extrarrenal y se encuentra mediado principalmente por el SNS.

#### **Vía del receptor $\beta$ -adrenérgico.**

Los efectos sobre la secreción y liberación de renina son mediados por la activación de los receptores  $\beta_1/\beta_2$ , lo cuales se expresan en las terminales nerviosas pre- y posganglionares ubicadas en diversas regiones del riñón incluyendo el polo vascular glomerular donde colocalizan con las células yuxtaglomerulares; la delección de estos receptores reduce significativamente la expresión de renina, esta reducción es mayor que la observada solo por el bloqueo farmacológico o en riñones denervados (Kim y Iwao, 2007).



## **Mácula densa**

El barorreceptor intrarrenal se encuentra localizado en la arteriola aferente, se encarga de sensar la presión de perfusión, cuando la presión de perfusión disminuye por debajo de (85 mmHg), envía la señal rápidamente la señal hacia la macula densa para que libere sustancias vasoconstrictoras o vasodilatadoras, dentro de estas se encuentra la adenosina que al unirse a su receptor  $A_1$  induce vasoconstricción de la arteriola aferente para restablecer la hemodinámica renal (Kurtz y col., 2011). Otro de los mediadores que se pueden liberar son las prostaglandinas, en particular la  $PGE_2$  y la  $PGI_2$ , que inducen la liberación de renina para llevar a cabo la formación de Ang II que ejerce sus efectos sobre la arteriola eferente para causar vasoconstricción, para restaurar la hemodinámica renal.

Estudios realizados *in vitro* en aparato yuxtaglomerular aislado de conejo mostraron que la administración aguda de inhibidores no selectivos de las COXs como el ácido flufenámico, flurbiprofeno o el NS-398, disminuyen la secreción de renina, mientras que los inhibidores selectivos de la COX-1 como el valeril salicilato no tienen efecto sobre la secreción de renina (Traynor y col., 1999). *In vivo* el aumento de la expresión de la COX-2 y de la síntesis de la  $PGE_2$  y la  $PGI_2$  son requisitos previos para la liberación de renina. Ratones con delección de los receptores  $EP_2^{-/-}$ ,  $EP_4^{-/-}$ ,  $IP$ , mostraron reducción significativa de la expresión de renina y de su actividad, tras la administración de una dieta baja en NaCl durante una semana (Fujino y col., 2004). Estos receptores son capaces de inducir la expresión de renina de las células yuxtaglomerulares, debido a que se acoplan a proteínas G y a la estimulación de la adenilato ciclasa 5 y 6 presente en las células secretoras de renina, la adenilato ciclasa cataliza la conversión de ATP en AMP cíclico que, a su vez, estimula la actividad de cinasas de proteínas como la PKA (Castrop y col., 2005; Cheng y col., 2007). El AMPc se une a las dos subunidades regulatorias de la PKA para liberar dos subunidades catalíticas del complejo inactivo tetrámero PKA. Las subunidades catalíticas libres se traslocan al núcleo y fosforilan factores de transcripción como el elemento de respuesta al AMPc

llamado (CREB), el cual se une a la región consenso del gen de renina para iniciar su transcripción. El transcrito del gen de la renina da lugar a la preprorenina con un peso molecular de 48 kDa. La prorenina enzimáticamente inactiva pasa al aparato de Golgi, para ser secretada de manera constitutiva, o puede ser glicosilada para ser almacenada en las células yuxtglomerulares. Dentro de las vesículas secretoras un propéptido de 43 aa, se escinde proteolíticamente para producir la renina enzimáticamente activa cuyo peso molecular es de 41 kDa (Castrop y col., 2000).

#### **1.2.7.1 Liberación de renina de las células yuxtglomerulares**

Mientras que el AMPc es la vía principal estimuladora de la liberación de renina, la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  se considera como el principal inhibidor. Así la Ang II, la endotelina 1, la vasopresina, y la norepinefrina son vasoconstrictores que no solo incrementan la afluencia de  $Ca^{2+}$  intracelular hacia la célula yuxtglomerular, sino que también causan su despolarización (Grünberger y col., 2006). El aumento en la concentración de  $K^+$  extracelular o la inhibición este canal conduce a la despolarización de la célula yuxtglomerular y al bloqueo de la liberación de renina. Por lo que, la hiperpolarización de la membrana inducida por la activación del canal de  $K^+$  o por la inhibición del canal de  $Cl^-$  está acompañada por la liberación de renina (Friis y col., 2013). Posteriormente del hígado se libera el angiotensinógeno, sobre el cual actúa la renina para degradar 10 aa para formar la Ang I la cual a través de la acción de la enzima convertidora de angiotensina forma a la Ang II.

### **1.2.7.2. Participación de la COX-2 y del sistema renina angiotensina en la hipertensión arterial**

Durante el desarrollo de la hipertensión arterial se ha observado que existe una interrelación entre los prostanoïdes derivados de la COX-2 y el sistema renina angiotensina, se ha observado en modelos de hipertensión que son dependientes del sistema renina angiotensina.

Al considerar los efectos de la isoforma específica sobre la presión sanguínea, Qi y col., (2002) mostraron que la COX-2 promueve el desarrollo de la hipertensión arterial, a través de la producción excesiva de prostanoïdes vasoconstrictores y aumentar la actividad del sistema renina angiotensina (Bivol y col., 2005).

Durante la infusión de dosis presoras y subpresoras de Ang II, no modifican la expresión de la COX-2 cortical renal, debido a que la Ang II a través de su unión al receptor AT<sub>1</sub> ejerce un efecto de retroalimentación negativo sobre la expresión de COX-2 en la macula densa (Wolf y col., 1999).

Por otro lado el aumento en la actividad de la COX-2 apoya la elevación de la presión sanguínea por inducir la liberación de renina. Esto es demostrado por la atenuación mediada por el inhibidor selectivo de la COX-2 en el modelo de 2K1C y la presión sanguínea normal observada en ratones con delección de la COX-2 (qi y col., 2002).

Estos efectos divergentes de la COX-2 sobre la presión sanguínea probablemente reflejan otro aspecto complicado de la interacción entre la COX-2 y el SRA, la expresión de COX-2 específica de las células en respuesta a Ang II. El receptor AT<sub>1</sub> disminuye la expresión de COX-2 de la mácula densa pero aumenta la expresión de COX-2 en las células mesangiales, células glomerulares y células del músculo liso vascular. Las vías de señalización utilizadas por el receptor AT<sub>1</sub> para aumentar la expresión de COX-2 varían.

En las células del músculo liso, la expresión de la COX-2 es mediada por la vía de señalización de las MAP cinasas. Por otro lado, la regulación de la expresión de la

COX-2 en las células mesangiales y glomerulares implica la producción de especies reactivas de oxígeno (Ohnaka y col., 2000).

En ratas transgénicas Cyp1ARen2, los efectos mediados por la COX-2 sobre la presión sanguínea pueden ser el resultado del aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. La disminución de la presión sanguínea tras la inhibición de la COX-2 no explica por sí solo los efectos sobre la liberación de renina, ya que la secreción constante de la renina de las células yuxtaglomerulares, no solo es dependiente de la actividad de la COX-2, sino que también está determinada por el sistema nervioso simpático y el barorreceptor intrarrenal, por lo que la concentración de renina se mantiene constante. En este modelo el estrés oxidativo afecta la actividad de la COX-2 y las sintasas de prostaglandinas (Howard y col., 2005).

El exceso de especies reactivas de oxígeno reacciona con el óxido nítrico para formar peroxinitrato el cual aumenta la actividad de la COX-2. Sin embargo, la reducción consecuente de la disponibilidad de óxido nítrico aumenta la actividad de la sintasa de TXA<sub>2</sub>, estimulando de esta forma mayor síntesis de TXA<sub>2</sub>, para incrementar la presión sanguínea (Wade y col., 1997). En respuesta a la disminución de sodio en la dieta, varios sistemas paracrinos están involucrados en las adaptaciones que contribuyen a la regulación del consumo de sodio. Los principales mecanismos son el sistema renina-angiotensina y las prostaglandinas. La activación de estos sistemas es evidente ya que se ha observado que tras la reducción de sodio, se incrementa la concentración plasmática de renina y la excreción urinaria de prostaglandinas (Yang y col., 1998).

Durante la restricción de sodio se ha observado que aumenta la expresión de la COX-2 en la mácula densa y a través de la síntesis de prostanoides vasodilatadores mantiene la tasa de filtración glomerular y el flujo sanguíneo constante. Otro aspecto importante es que la COX-2 es capaz de inducir la expresión de la renina de las células yuxtaglomerulares y con ello regular la

actividad del sistema renina angiotensina (Rodríguez y col., 2000). Sin embargo, los cambios en la expresión de la COX-2 no siempre se correlacionan con los efectos sobre el funcionamiento renal.

La restricción de sodio en ratas transgénicas Cyp1ARen2 parece no estar influenciada por la COX-2 ya que no se observan cambios en la tasa de filtración glomerular y en el flujo sanguíneo renal, mientras que en ratas Sprague Dawley existe una dependencia total de las prostaglandinas en mediar la hemodinámica renal (Vaneckova y col., 2004) .

La restricción de sodio también puede influir en la actividad y en la síntesis de los prostanoïdes. Por ejemplo la actividad de la sintasa de prostaciclina no se modifica tras la restricción de sodio (Mason y col., 1984), mientras que la actividad de la sintasa de PGE aumenta, tras la restricción de sodio.

La PGE a través de su unión al receptor EP<sub>4</sub> también aumenta, promueve la reabsorción de sodio en el conducto colector (Sakairi y col., 1995) y la vasodilatación en las células musculares lisas, por lo que contribuye a que la síntesis de TXA<sub>2</sub> disminuya (Wilcox y col., 2003).

**Disminución de la presión de perfusión:** se ha observado que en condiciones normales el riñón presenta una mínima expresión del gen que codifica para COX-2 en la mácula densa (Cheng y col., 1999), tras la reducción del flujo sanguíneo hacia uno de los riñones después de 7 días se sobreexpresa la COX-2, este incremento precede al de renina y de su actividad a nivel plasmático. En presencia de inhibidores selectivos de COX-2 como el NS-398 disminuye la expresión, la actividad de renina, así como la presión sanguínea (Wang y col., 1999), lo que sugiere que COX-2 participa en el aumento de la expresión de renina y posiblemente también en la regulación de la presión arterial.

En otros modelos de hipertensión arterial como el de 2 riñones, 1 Clip (2K, 1C), o 1 riñón, 1 clip (1K, 1C) la administración de inhibidores no selectivos para COX-2

como la aspirina o mofezolac y que son inhibidores selectivos de COX-1, se ha observado que la expresión de renina no se modifica, (Okumura y col., 2002). Lo que sugiere que el efecto sobre la expresión de renina es mediado principalmente por la COX-2.

Durante la inhibición de la síntesis de óxido nítrico a través de la administración de análogos de la L-arginina como el N<sup>w</sup>-nitro metil ester o L-NAME, tomada y col., (2003), mostraron que la COX-2 puede estar involucrada en el desarrollo de la hipertensión arterial a través de la formación de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>.

## 2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El riñón es una fuente rica de prostaglandinas, formados por el metabolismo del ácido araquidónico, dependientes de la ciclooxigenasa; son mediadores fisiológicos de la hemodinámica glomerular renal y de la reabsorción tubular de  $\text{Na}^+$  y agua (Walter y col., 1987; Breyer y col., 2008). La COX-2 se localiza en la porción ascendente gruesa del asa de Henle y en la mácula densa (Harris y col., 1994; Komhoff y col., 1997). En esa región, la COX-2 y la renina incrementan en paralelo ante estímulos como, la dieta baja en sal (Harris y col., 1994), la disminución del flujo sanguíneo (Harther y col., 1998), o con la administración de diuréticos como la furosemida (Schricker y col., 1995). Sin embargo, la administración de inhibidores selectivos de COX-2 disminuye la expresión de renina. Así, se ha descrito que la COX-2 vía prostaglandinas vasodilatadoras,  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$ , es responsable de estimular la expresión del RNAm (Schricker y col., 1995) y la secreción de renina de las células yuxtglomerulares (Jensen y col., 1997).

Durante el desarrollo de la hipertensión arterial se ha mostrado que la COX-2 aumenta la activación del SRA, en modelos que tienen una producción basal de óxido nítrico, como la coartación aórtica (Cheng y col., 1999), y 2 riñones-1 Clip. En estos modelos, la inhibición de la COX-2 normaliza la presión arterial, evento asociado con la disminución en la expresión de renina y de Ang II plasmática, indicador importante de la activación del SRA (Okumura y col., 2002). De manera interesante, en modelos independientes del SRA, como DOCA-sal, la expresión de COX-2 está disminuida, así como, la actividad (Okumura y col., 2002). Así, es muy relevante estudiar la coincidencia temporal entre la expresión de la COX-2 y de la renina, así como la participación de COX-2 en la regulación del sistema renina-angiotensina, durante el desarrollo de la hipertensión arterial, por inhibición de la síntesis de óxido nítrico.

### **3.0 JUSTIFICACIÓN**

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica, degenerativa y multifactorial, es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, ya que lesiona vasos sanguíneos cardiacos, renales y cerebrales, produciendo enfermedades como: insuficiencia cardiaca, accidente cerebrovascular, enfermedad isquémica, arterioesclerosis y daño renal. La HTA primaria o esencial es de causa desconocida, y los estudios epidemiológicos, muestran que más del 90% de los casos de hipertensión son de tipo primaria; se estima que entre el 20 y 30% de la población adulta padece alguna forma de HTA y entre las personas mayores de 60 años la prevalencia es superior al 50%. La combinación de factores como: edad, sexo, actividad física, dieta, sobrepeso y factores sociales y psicológicos favorecen su aparición.

Existen diversos mecanismos que contribuyen al desarrollo de esta patología, como el sistema renina angiotensina, que de acuerdo con las evidencias, el aumento en su actividad puede estar relacionado con la expresión y la actividad de COX-2 renal.

Debido a que no existen estudios que analicen la función de la COX-2 renal, en la activación del sistema renina angiotensina durante el desarrollo en la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico, resulta importante estudiar si existe una relación temporal entre la expresión de COX-2 y la renina, así como, el posible papel de COX-2 en la regulación del sistema renina-angiotensina.

### **4.0 HIPÓTESIS**

El aumento en la expresión de la ciclooxygenasa-2 renal promueve la activación del sistema renina-angiotensina y el incremento de la presión arterial sistémica, en la hipertensión inducida por L-NAME.



## 5.0 OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la COX-2 de la corteza renal en la regulación del sistema renina-angiotensina durante el desarrollo de la hipertensión arterial inducida por L-NAME.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Evaluar la relación temporal entre la presión arterial sistólica y la excreción urinaria de los metabolitos del óxido nítrico durante el desarrollo de la hipertensión arterial inducida por L-NAME.
- ◆ Determinar si existe una relación temporal entre la expresión de COX-2 y la renina renales durante el desarrollo de la hipertensión inducida por L-NAME.
- ◆ Determinar la actividad de las COXs, a través de la producción de prostaglandinas renales, durante el desarrollo de la hipertensión arterial
- ◆ Determinar si la inhibición de la COX-2 y/o la enzima convertidora de angiotensina (ECA) modifican la hipertensión arterial inducida por L-NAME.
- ◆ Evaluar si la inhibición de la COX-2 y de la ECA, modifican la expresión de COX-2 y de la renina en el riñón de ratas hipertensas.
- ◆ Determinar si la inhibición de la COX-2 y de la ECA, modifican la síntesis de prostanoides renales de ratas hipertensas.
- ◆ Determinar si la inhibición de la ciclooxigenasa-2 y/o la ECA, modifican la angiotensina II en plasma.

## 6.0 MÉTODOS

### 6.1. Reactivos

#### 6.1.1. Uso general

Para la preparación de la solución fisiológica de Krebs las sales utilizadas fueron de los laboratorios J.T. Baker: NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> y glucosa.

#### 6.1.2. Uso específico

Clorhidrato del éster metílico de la N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME), Captopril, Celecoxib fueron adquiridos del laboratorio Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A).

L-NAME y Captopril: Se prepararon soluciones Stock de 10 mg/ml. A partir de esta solución se calcularon los volúmenes adecuados que corresponden a la dosis ajustada al consumo de agua y al peso de cada rata, la dosis que se utilizó fue de 75 mg/ml para el L-NAME y de 30 mg/ml para captopril.

Celecoxib. Se preparó una solución de 1 mg/ml, a partir de esta solución se calcularon los volúmenes adecuados que correspondieron a la dosis ajustada al consumo de agua y al peso de cada rata.

### Biología molecular

Trizol reagent (Invitrogen), alcohol isopropílico, cloroformo, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A), agua tratada con DEPC (Invitrogen), Transcriptasa reversa, SYBR Green Master Mix (Fermentas), todos los reactivos utilizados fueron grado biología molecular.

## **6.2. Material biológico**

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar macho de 250-300 g de peso que fueron suministrados por el Bioterio de la FES-Iztacala, UNAM. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones de alimentación, temperatura e higiene controladas y ciclos de luz-oscuridad de 12 h por 12 h.

### **6.2.1. Estudios *in vivo***

#### **6.2.1.1. Hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico por L-NAME**

Serie experimental 1: Se formaron 10 grupos de 6 ratas cada uno a las que se les administró el vehículo o L-NAME (75 mg/kg/día) en el agua de beber durante 1, 2, 4, 8, 12, 15, 19, 25, 28 y 33 días.

Serie experimental 2: Se formaron 10 grupos de 6 ratas y fueron los siguientes (2 grupos fueron controles, 2 grupos fueron tratados sólo con L-NAME, 2 grupos tratados con L-NAME más un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (captopril), la dosis de que se utilizó de captopril fue de 30 mg/kg/día, 2 grupos fueron tratados con un inhibidor selectivo de la COX-2 (celecoxib) la dosis que se utilizó fue de 1mg/kg/día, y 2 grupos se les administro la combinación de L-NAME más captopril y celecoxib. Los tratamientos fueron administrados por via oral durante 2 y 19 días, estos tiempos se escogieron a partir del curso temporal de la expresión del RNAm de la COX-2 y de renina. Al inicio y al final de cada uno de estos tratamientos se registró la presión arterial sistólica por pletismografía no invasiva. Las ratas fueron colocadas en cajas inmovilizadoras, dejando al descubierto la extremidad caudal. Posteriormente fueron colocadas en una cámara de acondicionamiento Heater and Scanner LE565/6 LSI LETICA a una temperatura de 40 °C. Se esperó un periodo de 10 min para que el registro del pulso fuera homogéneo. Se procedió a determinar la presión arterial a través de un transductor de presión (LE 5007) LSI LETICA colocado en la arteria caudal y

conectado a una computadora y el registro de PAS se obtuvo mediante el programa Chart 4.0.

#### **6.2.1.2. Cuantificación de nitritos y nitratos urinarios de ratas hipertensas**

La concentración de nitritos y nitratos urinarios se determinaron en muestras de orina de 24 h, en animales tratados con L-NAME (75 mg/kg/día) y controles, mediante un kit comercial (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo se describe brevemente a continuación.

El kit colorimétrico para determinar nitritos y nitratos presentes en las muestras de orina de 24 h requiere de un proceso de dos etapas. El nitrato se redujo a nitrito por incubación de 3 h con la nitrato reductasa en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) y flavin adenina dinucleótido (FAD). En el segundo paso los nitritos son sometidos a una reacción de diazotización con la sulfanilamida para formar ácido sulfanílico, el cual al acoplarse con la N-1-Naftil-etilenediamina, se genera el ión diazolio cuantificable en espectrofotómetro a 570nm.

### **6.3. Estudios *in vitro***

#### **6.3.1. Producción renal de prostanoides de ratas normotensas e hipertensas**

Al término de cada uno de los tratamientos, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico con una dosis de 60 mg/kg (vía i.p.), cada rata se colocó en una tabla de disección, se le realizó una incisión media en la cavidad abdominal, se expuso el riñón derecho y se disecaron las arterias mesentérica, aorta y renal, referidas con hilo seda, se canuló la arteria renal a través de la arteria mesentérica con la finalidad de perfundir el riñón con solución Krebs (composición en mM: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 2.4, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> 25 y glucosa 10); burbujeado con carbógeno (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95:5%) a un pH de 7.4, y a 37 °C, a un flujo constante de 10 ml/min. Los cambios en la presión de perfusión

fueron detectados por un transductor (Astro-Med, West Warwick, RI, U.S.A.) acoplado a un sistema de análisis MP100 (Biopac Instruments, Inc., Santa Barbara, CA, U.S.A.) y los datos fueron procesados por el programa Acqknowledge (Biopac). El riñón se estabilizó durante 60 min. Después del periodo de estabilización se colectó el perfusado renal para llevar a cabo la cuantificación de los prostanooides.

### **6.3.2. Medición de 6-cetoPGF<sub>1α</sub> y tromboxano B<sub>2</sub> en los perfusados renales**

La cuantificación de la 6-cetoPGF<sub>1α</sub> y tromboxano B<sub>2</sub> se realizó con un estuche comercial (Cayman Chemical), que es una manera indirecta de medir la concentración de prostaciclina y tromboxano A<sub>2</sub>.

Este ensayo se fundamenta en la competencia entre la 6-cetoPGF<sub>1α</sub> o el tromboxano B<sub>2</sub> libre y un conjugado de 6-cetoPGF<sub>1α</sub> o el tromboxano B<sub>2</sub> unido a una molécula de acetilcolinesterasa, el complejo anticuerpo- prostaglandina, ya sea libre o la unida a la acetilcolinesterasa, es reconocido por un segundo anticuerpo de ratón anticonejo específico para la 6-cetoPGF<sub>1α</sub> o el tromboxano B<sub>2</sub>, que ha sido fijado previamente a las paredes de los pozos en donde se lleva a cabo la reacción. La placa se lava para eliminar cualquier sustancia que no haya formado el complejo y se adiciona a cada uno de los pozos el reactivo de Ellman originando un producto de color amarillo cuantificable en el espectrofotómetro a 412 nm (Microplate; BIORAD), que es inversamente proporcional a la cantidad de 6-cetoPGF<sub>1α</sub> o tromboxano B<sub>2</sub>.

## 6.4. Experimentos de biología molecular

### 6.4.1. Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total, la corteza renal se homogeneizó en 1 ml Trizol Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.). Se adicionaron 100  $\mu$ l de cloroformo al homogenado, las muestras se agitaron en el vortex durante 1 min y se dejaron a una temperatura de -70 °C durante 20 min para la separación de fases, las muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 min, se extrajo la fase acuosa y el RNA se precipitó con 500  $\mu$ l de isopropanol. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 75% diluido en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

### 6.4.2. Síntesis de cDNA

El RNA se cuantificó diluyendo el RNA en agua DEPC y midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Para la reacción de transcriptasa reversa se tomaron 2  $\mu$ l de RNA total, teniendo en cuenta que la unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40  $\mu$ g de RNA.

En un tubo con 2 $\mu$ l de RNA se agregó una mezcla de reacción con: Buffer 5X, oligo DT, dNTPS y transcriptasa reversa. El volumen se ajustó con agua DEPC a 20  $\mu$ l. La mezcla se calentó a 37 °C durante 1 hora y para detener la reacción enzimática se aumentó la temperatura a 72 °C por 10 min.

### 6.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la PCR para COX-2 y renina con “primers” específicos (Boustany 2004 y Tomida y col., 2003). El gen de referencia que se utilizó fue el 18Sr, todos los “primers” fueron de Invitrogen. Para la cuantificación relativa se utilizó un termociclador Corbette Research Rotor Gene-3000 (Sydney, Australia). Las secuencias de los primers se detallan a continuación: Para COX-2 cDNA fue amplificado con primers 5' GGC TGC GGG AAC ATA ATA GA 3' (forward) y 5'

AAA AGC AGC TCT GGG TCA AA 3' (reverse); renina cDNA, con primers 5' TTC TCT CCC AGA GGG TGC TA 3' (forward) y 5' CCC TCC TCA CAC AAC AAG GT 3' (reverse) y 18 Sr cDNA, con primers 5' GGG AGC CTG AGA AAC GGC 3' (forward) y 5' GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT 3'(reverse). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: para COX-2 una etapa inicial de 95 °C por 30 seg, seguido de 35 ciclos a 60 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg; para renina una etapa inicial de 94 °C por 45 seg, seguido de 40 ciclos por 45 seg a 60 °C por 45 seg, 72 °C por 45 seg. Cada reacción de PCR incluyó 13.5 µl de Taqman Universal, 7.5 µl ensayo 20X de SYBR Green Master Mix y 1.5 µl de cDNA diluido en agua DEPC.

### **6.5. Angiotensina II plasmática**

La Ang II, se determinó en el plasma de rata por electroforesis capilar de zona, bajo detección UV por arreglo de diodos. La muestra se desproteinizó con metanol frío y posteriormente con ácido tricloroacético al 5% frío, en ambos casos, en proporción 10:1. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 10°C y el sobrenadante se diluyó 1:10 con NaOH 0.1 M frío, se pasó la muestra por un cartucho Sep-PakClassic C-18 frío, se filtró con membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm y se analizó directamente con el sistema P/ACE™ MDQ de BeckmanCoulter (BeckmanCoulter, Fullerton, CA, U.S.A.), al cual se le preacondicionó el capilar haciendo pasar una solución 1.0 M NaOH durante 30 min, posteriormente agua desionizada por 30 min y finalmente el amortiguador de corrida (ácido bórico 100 mM + ácido tartárico 3 mM + cloruro de oro III 10 fM a pH 9.8) durante 30 min. La muestra se inyectó bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10s. La separación se realizó con el amortiguador de corrida a 30 kV durante 10 min a 200 nm a 20 °C. El capilar se lavó entre corridas con NaOH 1.0 M durante 2 min y agua desionizada por 2 min. Los resultados se expresan en pmoles/ml. La concentración de Ang II se determinó mediante el empleo de una curva estándar.

## **6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Con los datos obtenidos de todas las series experimentales se calculó la media y el error estándar de la media; posteriormente, para determinar la significancia entre los tratamientos, se utilizó ANOVA de un factor o de dos factores según fuera el caso, seguido por la prueba post hoc de Tukey y la prueba se consideró significativa cuando el valor de  $p < 0.05$  y se utilizó el programa Graph Pad Prisma versión 5 para Windows, San Diego, California, U.S.A.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Curso temporal de la excreción urinaria de nitritos y nitratos en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico

El L-NAME (75 mg/kg/día) inhibió de manera inespecífica la actividad de las isoformas de la sintasa de NO. Para cuantificar este efecto, se colectaron muestras de orina de 24 h a lo largo de 33 días de tratamiento. Los animales fueron entrenados durante 2 semanas, las ratas fueron colocadas cada tercer día antes de iniciar la fase experimental y posteriormente sólo fueron colocados en cajas metabólicas en los siguientes tiempos: debido a la cercanía del tiempo las ratas fueron dejadas los días 1 y 2 en las cajas metabólicas, posteriormente las ratas fueron colocadas el día 4, 8, 12, 15, 19, 25, 28 y 33 en las cajas metabólicas. El NO se cuantificó por sus metabolitos estables  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . En la Fig. 4. se observa que la excreción urinaria de nitratos y nitritos en promedio fue  $902 \pm 62 \mu\text{M}$  en las ratas normotensas, valor que se mantuvo con variación no significativa a lo largo de los 33 días de tratamiento. En las ratas hipertensas por L-NAME disminuyó la producción de nitritos y nitratos a partir del día 2 y hasta el día 8, cayendo a una concentración de  $22 \pm 7 \mu\text{M}$ ; posteriormente a partir del día 25 hasta el 33 se detectó una concentración de nitritos y nitratos de  $68 \pm 23 \mu\text{M}$ .

En relación al volumen urinario no se observaron cambios significativos entre las ratas control e hipertensas, el valor promedio fue de  $30 \pm 3 \text{ ml}$ .

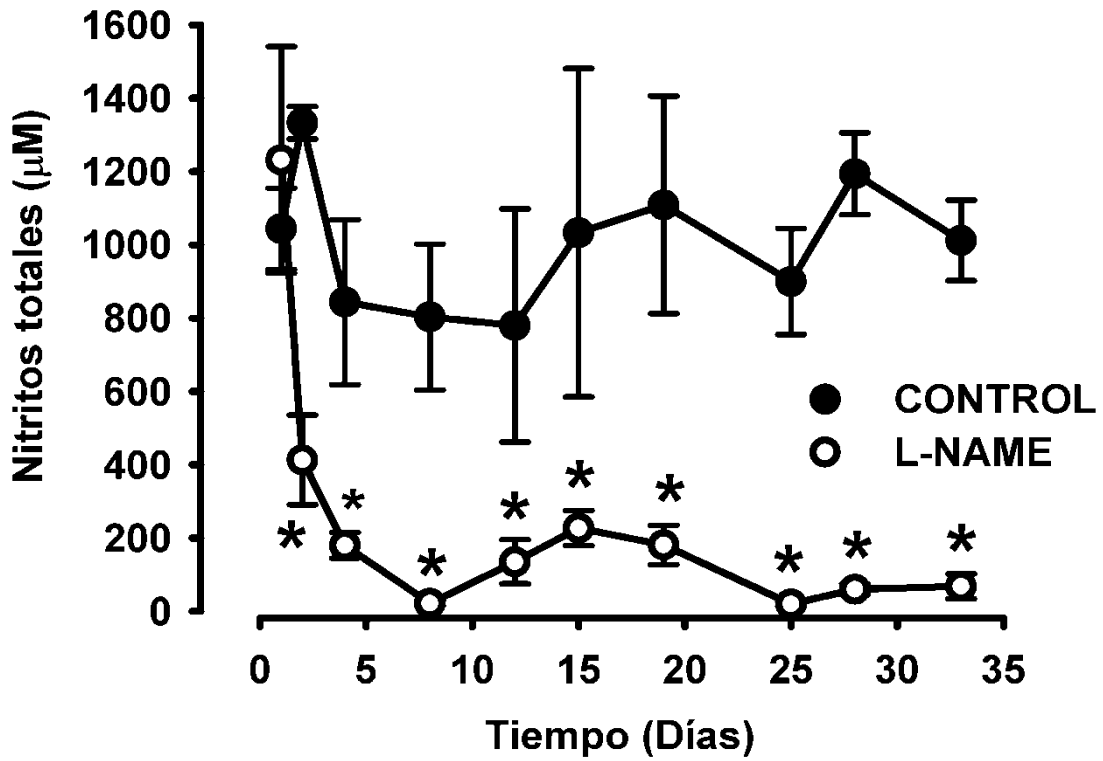


Figura 4. Curso temporal de la excreción urinaria de nitritos y nitratos de ratas control y tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME) (75 mg/kg/día) vía oral, durante 33 días. Cada punto representa el promedio ± EEM de 6 ratas por grupo. \**P* < 0.05 control vs L-NAME.

## **7.2. Curso temporal de la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

En las ratas tratadas con L-NAME la disminución de NO se asoció con el incremento de la presión arterial sistólica (PAS) (Fig. 5). El curso temporal de la PAS en ratas normotensas e hipertensas, muestra que en las ratas normotensas, la PAS se mantuvo en un valor promedio de  $120 \pm 5$  mmHg a lo largo de los 33 días de tratamiento, y esta se asoció con la producción basal de NO, el cual contribuye a la regulación de la presión arterial normal. En contraste, las ratas hipertensas mostraron un incremento rápido de la PAS en los primeros 4 días de tratamiento, con un valor promedio de  $160 \pm 4$  mmHg, posteriormente a partir del día 12 se observó un incremento paulatino alcanzando un valor promedio de  $184 \pm 7$  mmHg a los 33 días de tratamiento. Lo que sugiere que uno de los eventos iniciales que conllevan al desarrollo de la HTA es la inhibición de la síntesis de NO en este modelo. Sin embargo, en el establecimiento de la HTA además de la deficiencia de NO, participa el aumento de la acción de vasoconstrictores que de manera conjunta permiten el establecimiento, mantenimiento y progreso de la HTA.

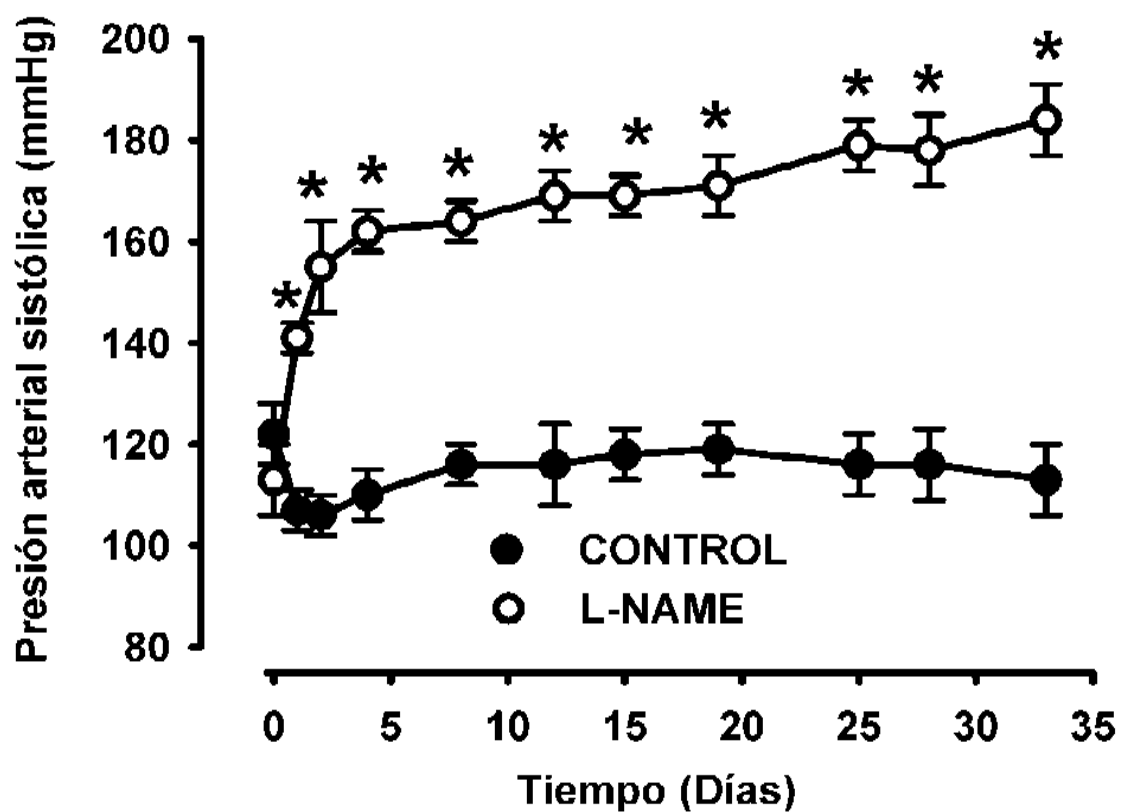


Figura 5. Curso temporal de la presión arterial sistólica de ratas control y tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), durante 33 días. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  control vs L-NAME.

### **7.3. Curso temporal de la expresión del RNAm de la COX-2 en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

Como se mencionó, en el modelo de hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de NO no hay reportes que muestren el curso temporal de la expresión de la COX-2 y la renina renales, por lo cual se decidió determinar la expresión del RNAm de ambas enzimas durante 33 días por la técnica de PCR-tiempo real; la expresión de ambos genes se normalizó con el gen de referencia 18s ribosomal (18Sr) que es un gen constitutivo, y esto es relevante para determinar si se presenta una expresión coordinada de ambas enzimas durante el desarrollo de la HTA por inhibición de la síntesis de NO. Los resultados mostraron que la expresión del RNAm de COX-2 aumentó un 35% a un día después de inhibir la NOS (Fig. 6). Este porcentaje de sobreexpresión se mantuvo los primeros 8 días, posteriormente aumentó de manera dependiente del tiempo, hasta el día 25 donde se alcanzó un incremento de (65%), y hacia el día 33 disminuyó 22% acercándose al valor basal del grupo control (Fig. 6). Las ratas normotensas (control) mantuvieron una expresión de COX-2 constante.

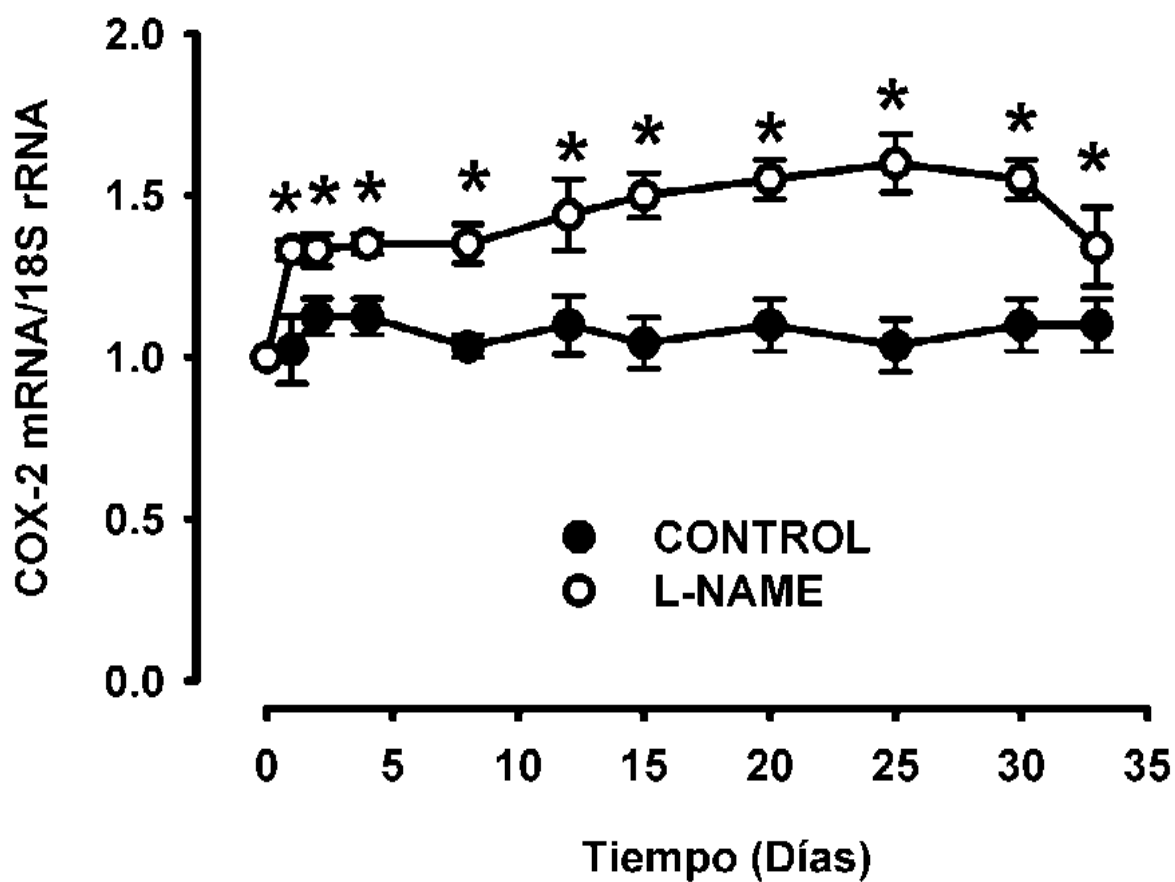


Figura 6. Curso temporal de la expresión del RNAm de la ciclooxygenasa-2 (COX-2) renal de ratas control y tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), durante 33 días. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  control vs L-NAM.

#### 7.4. Curso temporal de la expresión del RNAm de renina en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico

Los resultados mostraron que la expresión del RNAm de renina aumentó un 40% a los 2 días después de inhibir la NOS (Fig. 7). Alcanzando la máxima expresión a los 19 días (75%). Al igual que el RNAm de la COX-2, la expresión del RNAm de renina disminuyó a partir del día 25 y hasta los 33 días. Lo que indica coincidencia temporal entre la expresión del RNAm de la COX-2 y de la renina durante el desarrollo de la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de NO.

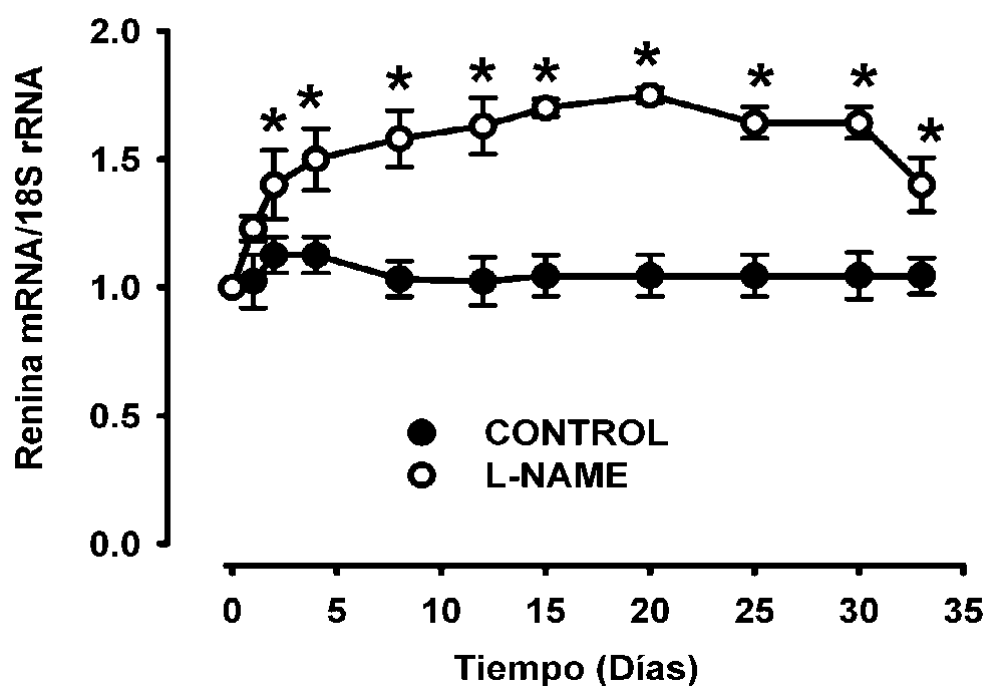


Figura 7. Curso temporal de la expresión del RNAm de renina cortical renal de ratas control y tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), durante 33 días. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  control vs L-NAME.

### **7.5. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto-PGF<sub>1α</sub>) en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

Para determinar la participación de las COXs durante el desarrollo de la hipertensión arterial, se cuantificó el valor basal de PGI<sub>2</sub>, de manera indirecta, a través de su metabolito estable 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> en muestras del perfusado de los riñones aislados de ratas normotensas e hipertensas, colectadas después de un periodo de estabilización de 60 min. Como se muestra en la Fig. 8, en las ratas normotensas la concentración de 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> fue  $187 \pm 62$  pg/ml. En las ratas hipertensas la 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> se incrementó: 1 día ( $360 \pm 165$  en las ratas hipertensas vs  $187 \pm 62$  pg/ml del grupo control), 2 días ( $426 \pm 54$  en las ratas hipertensas vs  $243 \pm 30$  pg/ml del grupo control), 8 días ( $122 \pm 8$  en las ratas hipertensas vs  $71 \pm 28$  pg/ml del grupo control) y 19 días ( $114 \pm 8$  grupo control vs  $186 \pm 14$  pg/ml ratas hipertensas). A partir del día 25 y hasta el 33 día de tratamiento, no se modificó la concentración de prostaciclina con respecto a los 2 y 19 días de tratamiento. Lo que sugiere que la prostaciclina se sintetiza como mecanismo compensatorio ante la falta de NO, con lo cual podría contribuir a restablecer el tono vasomotor normal a través de su acción vasodilatadora.



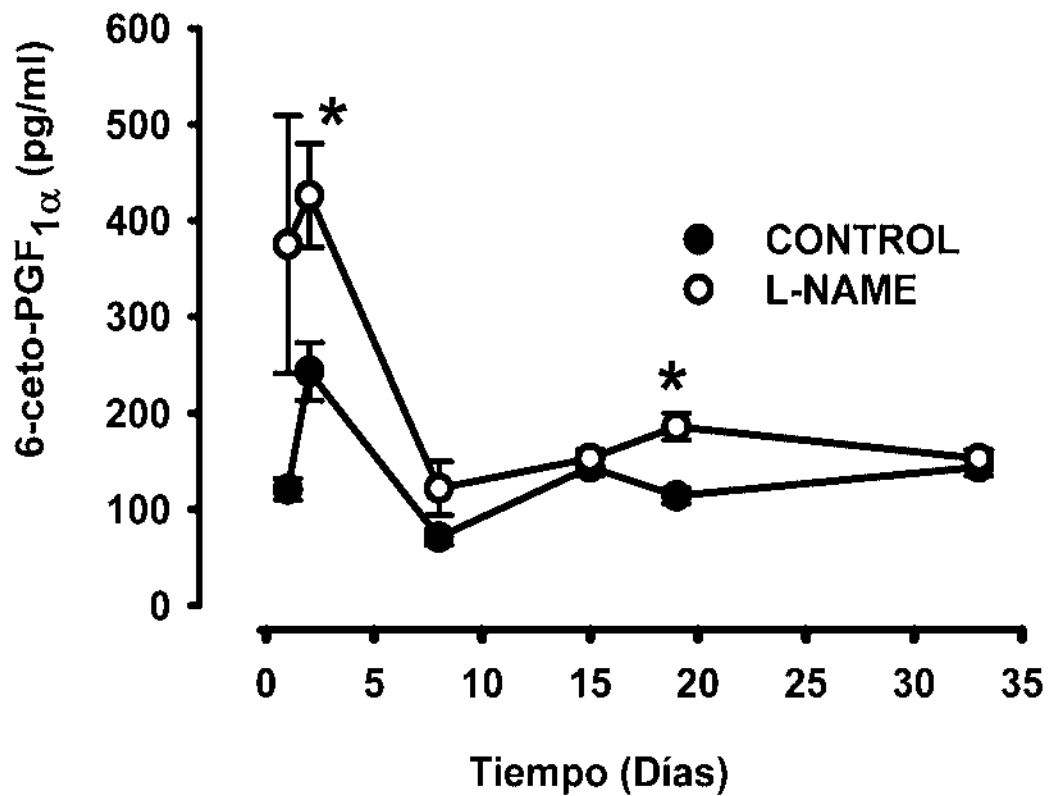


Figura 8. Cuantificación del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto-PGF<sub>1α</sub>) presente en el perfusado del riñón de ratas control y tratadas con N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), durante 33 días. Cada punto representa el promedio ± EEM de 6 ratas por grupo. \**P* < 0.05 control vs L-NAME.

### 7.6. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable del tromboxano (TxB<sub>2</sub>) en ratas normotensas e hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico

Con el fin de conocer en qué momento del desarrollo de la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de NO participa el TxB<sub>2</sub>, se cuantificó su producción basal en el perfusado del riñón aislado de ratas normotensas e hipertensas. Como se muestra en la Fig. 9, a partir del día 8 hasta el día 33 el valor de TxB<sub>2</sub> en las ratas normotensas oscila entre  $40 \pm 5$  pg/ml y para las ratas hipertensas oscila entre  $60 \pm 5$  pg/ml.

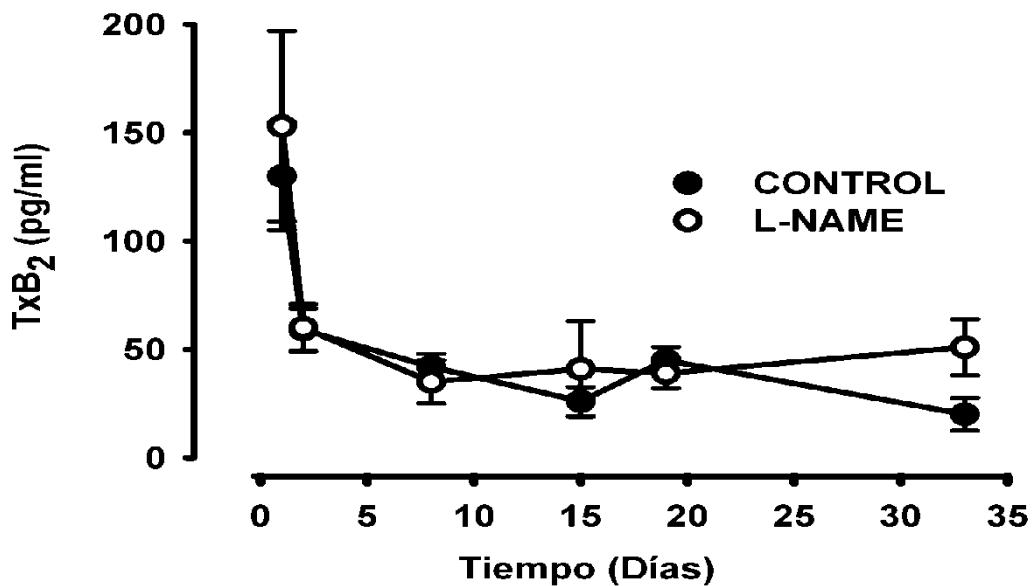


Figura 9. Curso temporal de la excreción renal del metabolito estable del tromboxano A<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) presente en el perfusado del riñón aislado perfundido de ratas control y tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), durante 33 días. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM de 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  control vs L-NAME.

### **7.7. Efecto de la inhibición de la COX-2 y de la ECA sobre la presión arterial sistólica en ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico por 2 y 19 días**

En base al curso temporal de la expresión génica para la COX-2 y la renina, se decidió investigar la posible relación causal entre la expresión de ambas enzimas para lo cual, se inhibió específicamente la actividad de COX-2 con celecoxib. También se inhibió la enzima convertidora de angiotensina con captopril para inducir una mayor expresión del RNAm de la ciclooxigenasa-2 y también se estudio el efecto sobre la PAS de ambos tratamientos. Los tratamientos se administraron de manera conjunta con el L-NAME durante 2 y 19 días.

La PAS en las ratas control fue de  $104 \pm 4$  a los 2 días y  $116 \pm 5$  mmHg a los 19 días. La inhibición de la NOS incrementó la PAS a los 2 días de tratamiento con L-NAME  $150 \pm 4$  mmHg (Fig.10a) y a los 19 días de tratamiento con L-NAME alcanzó  $166 \pm 3$  mmHg (Fig. 10b). De manera interesante, encontramos evidencia de que al inhibir la COX-2 y la combinación de L-NAME más celecoxib y captopril a los 2 y 19 días de tratamiento se previno parcialmente el incremento de la PAS inducida por la inhibición de la síntesis de NO. Esto sugiere que COX-2 participa en el desarrollo de la hipertensión arterial en este modelo.

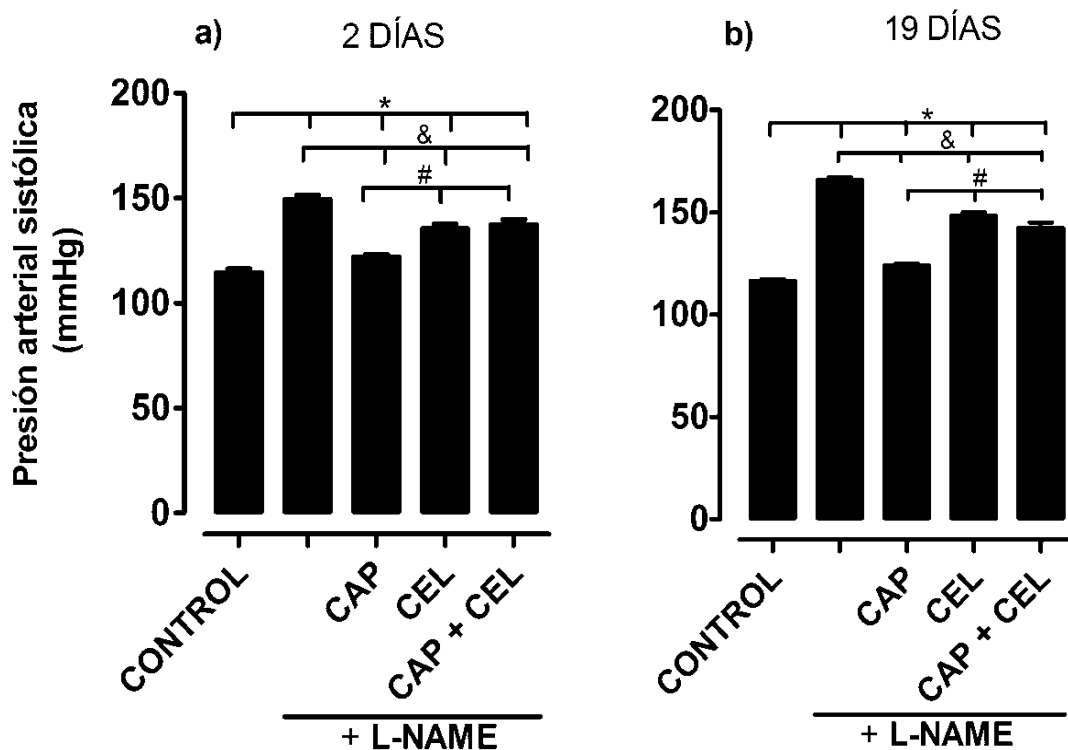


Figura 10. Efecto de la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) sobre la presión arterial sistólica de ratas tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), durante a) 2 días, (b) 19 días. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM de 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  control vs tratamientos; & $P < 0.05$  L-NAME vs tratamientos; #  $P < 0.05$  captopril (cap) vs L-NAME + Captopril + Celecoxib (cap + cel).

## **7.8. Efecto de captopril y de celecoxib sobre la expresión del RNAm de la COX-2 y de la renina en ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días**

Para mostrar una relación causal y temporal entre la expresión del RNAm de la COX-2 y la renina en la corteza renal, a ratas hipertensas se les administró celecoxib, captopril y a otro grupo se les administró conjuntamente captopril y celecoxib por 2 días. Como se observa en la figuras 11a y 11b en los grupos de ratas control se presenta una expresión basal del RNAm de la COX-2 y de la renina; sin embargo, en ratas tratadas con L-NAME, aumentó el RNAm de la COX-2 en un 44.2% con respecto al control. Cuando se administraron L-NAME + captopril, aumentó el RNAm de la COX-2 en un 82.7%, mientras que el tratamiento con L-NAME + celecoxib no modificó la expresión del RNAm de la COX-2 con respecto al grupo tratado sólo con L-NAME. El cotratamiento de las ratas hipertensas por L-NAME con celecoxib y captopril redujo la expresión de la COX-2 (34.6%) respecto a la observada solo con captopril al parecer por el cotratamiento con celecoxib (Fig. 11a).

De manera similar a lo que ocurrió con la COX-2, en las ratas hipertensas, el RNAm de renina aumento 47.3% (Fig. 11b). Cuando se administró L-NAME + captopril, la expresión de renina aumento 84.2%, mientras que el tratamiento con L-NAME+ celecoxib no modificó la expresión de renina (26.15%) con respecto sólo al tratamiento con L-NAME. En las ratas hipertensas tratadas con L-NAME y conjuntamente con celecoxib y captopril se observó una reducción de la expresión de renina en comparación a la observada solo con captopril, al parecer por el cotratamiento con celecoxib (Fig. 11b).

La inhibición de la actividad de COX-2 no afecta el aumento en la expresión de la COX-2 y de renina inducida por la deficiencia de NO. Sin embargo, la inhibición de la actividad de COX-2 afectó la sobreexpresión adicional de COX-2 y renina inducida por captopril (inhibición de la síntesis de Ang II) en la ratas con deficiencia de NO, lo que sugiere que Ang II es capaz de ejercer un efecto de

retroalimentación negativa sobre la expresión de la COX-2 y de renina en la corteza renal.

Para mostrar una relación temporal y causal entre la expresión (RNAm) de COX-2 y renina en la corteza renal, se les administró a las ratas L-NAME mas celecoxib o L-NAME mas captopril, y a un tercer grupo se le administró simultáneamente L-NAME mas captopril y celecoxib, por 19 días. Como se observa en la figura 11c y 11d, en los grupos control se presenta expresión basal del RNAm de la COX-2 y del RNAm de renina; sin embargo, en las ratas tratadas con L-NAME aumentó la expresión de la COX-2 en un 38.1% con respecto al control. Cuando se administraron L-NAME + captopril, aumentó la expresión de la COX-2 en un 70%, mientras que el tratamiento con L-NAME + celecoxib no modificó la expresión de la COX-2 en comparación con las tratadas con L-NAME (35.2%). El cotratamiento de las ratas hipertensas por L-NAME mas celecoxib y captopril redujo la expresión del RNAm de la COX-2 antes observada con captopril (86.7%) al parecer por el cotratamiento con celecoxib.

De manera similar a lo que ocurrió con la COX-2, en las ratas hipertensas por 19 días de tratamiento con L-NAME, aumento la expresión del RNAm de la renina en un 40% (Fig. 11d). Cuando se administró L-NAME + captopril, aumento la expresión de renina en un 70%, mientras que el tratamiento con L-NAME mas celecoxib no modificó la expresión de renina. El cotratamiento con L-NAME mas celecoxib y captopril redujo la expresión de renina antes observada solo con captopril al parecer por el cotratamiento con celecoxib (Fig. 11d).

La inhibición de la actividad de COX-2 no afecta la sobreexpresión cortical renal de COX-2 y renina inducida por la deficiencia de NO. Sin embargo, la inhibición de la actividad de COX-2 afectó la sobreexpresión adicional de COX-2 y renina inducida por captopril (inhibición de la síntesis de Ang II) en la ratas con deficiencia de NO, lo que sugiere que el tratamiento con celecoxib no inhibe la expresión de renina inducida por la deficiencia de NO, sin embargo si inhibe el aumento inducido por el tratamiento con captopril.

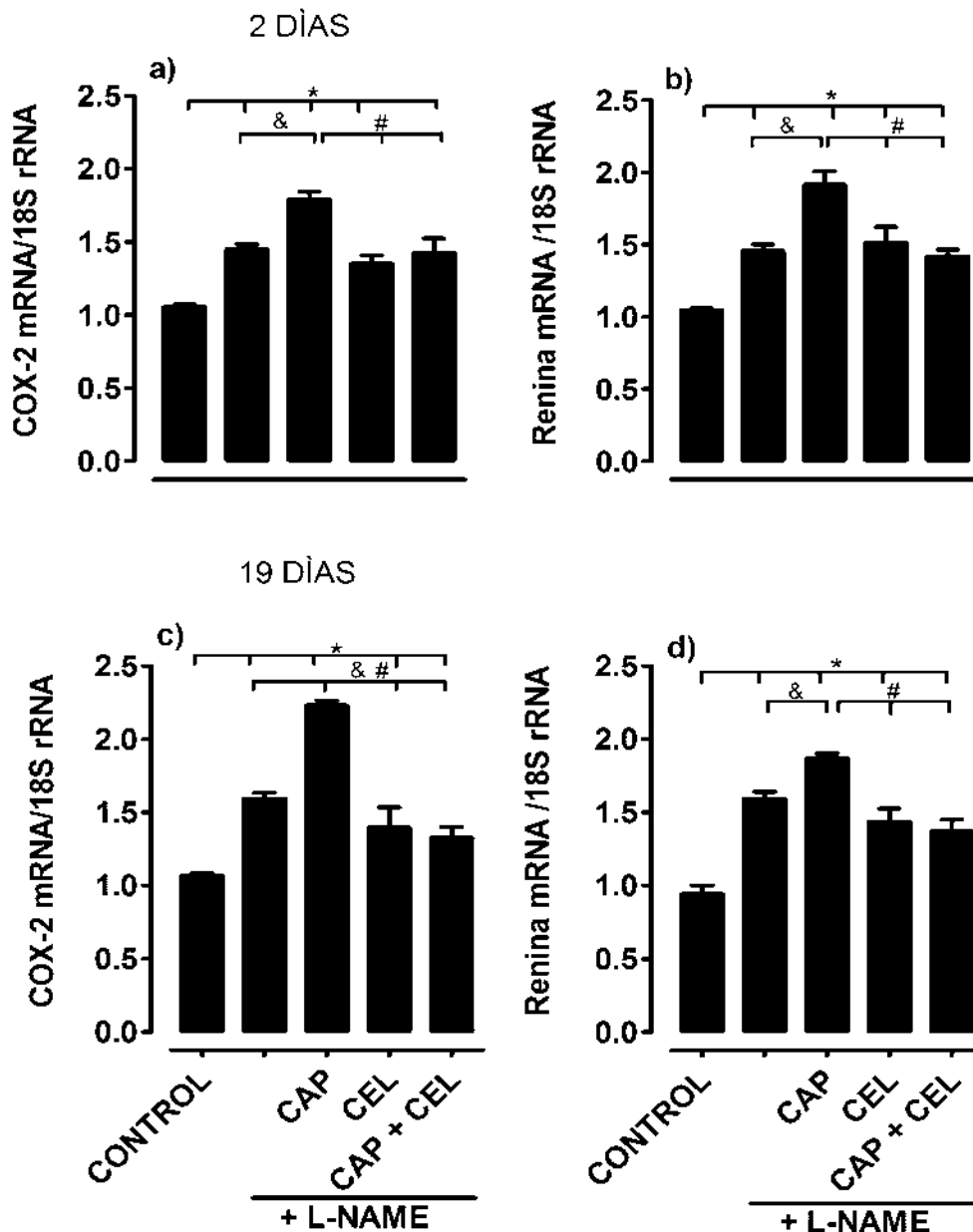


Figura 11.- Efecto de captopril y celecoxib en ratas tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), por 2 y 19 días: (a) expresión del RNAm de la COX-2 de 2 días; (b) expresión del RNAm de renina de 2 días; (c) expresión del RNAm de la COX-2 de 19 días; (d) expresión del RNAm de renina de 19 días. Los valores representan el promedio ± EEM de 6 ratas por grupo. \**P* < 0.05 control vs tratamientos; &*P* < 0.05 L-NAME vs tratamientos; # *P* < 0.05 captopril (cap) vs L-NAME + Captopril+ Celecoxib (cap + cel).

### **7.9. Síntesis in vitro del metabolito estable de la prostaciclina (6-ceto-PGF<sub>1a</sub>) y del metabolito estable del tromboxano (TxB<sub>2</sub>) de riñones aislados de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME por 2 y 19 día**

Para mostrar que la COX-2, a través de la síntesis de PGI<sub>2</sub>, es capaz de regular la expresión del RNAm de renina, se decidió cuantificar la síntesis basal de este prostanoide, durante 2 y 19 días. La concentración basal de prostaciclina a los 2 días fue de  $122 \pm 26$  pg/ml y a los 19 días de  $117 \pm 5$  pg/ml, que en conjunto con NO mantienen el tono vascular normal. Sin embargo, cuando se inhibió la síntesis de óxido nítrico se observó aumentó en la síntesis de prostaciclina con respecto al control siendo a los 2 días de  $297 \pm 47$  pg/ml (Fig. 12a) y a los 19 días de tratamiento  $245 \pm 14$  pg/ml (Fig. 12b), este efecto podría ser debido a una respuesta compensatoria ante la deficiencia de NO. El tratamiento con L-NAME + captopril incrementó la PGI<sub>2</sub> a  $369 \pm 67$  pg/ml, mientras que la inhibición de la COX-2 con celecoxib y la combinación de ambos fármacos redujeron la síntesis de PGI<sub>2</sub> a los 2 días ( $173 \pm 25$  pg/ml y  $144 \pm 17$  pg/ml, respectivamente) (Fig. 12b); mientras que a los 19 días solo se observaron diferencias significativas con respecto al control con los tratamientos con el L-NAME y L-NAME más captopril (Fig. 12b).

A los 2 días el tratamiento con L-NAME y L-NAME mas captopril incrementó la síntesis de tromboxano B<sub>2</sub>, mientras que los tratamientos con L-NAME más celecoxib o L-NAME más captopril y celecoxib no modificaron la síntesis de tromboxano B<sub>2</sub>, este efecto se observó nuevamente a los 19 días donde los tratamientos no modificaron la síntesis de tromboxano B<sub>2</sub> (Fig. 12d).



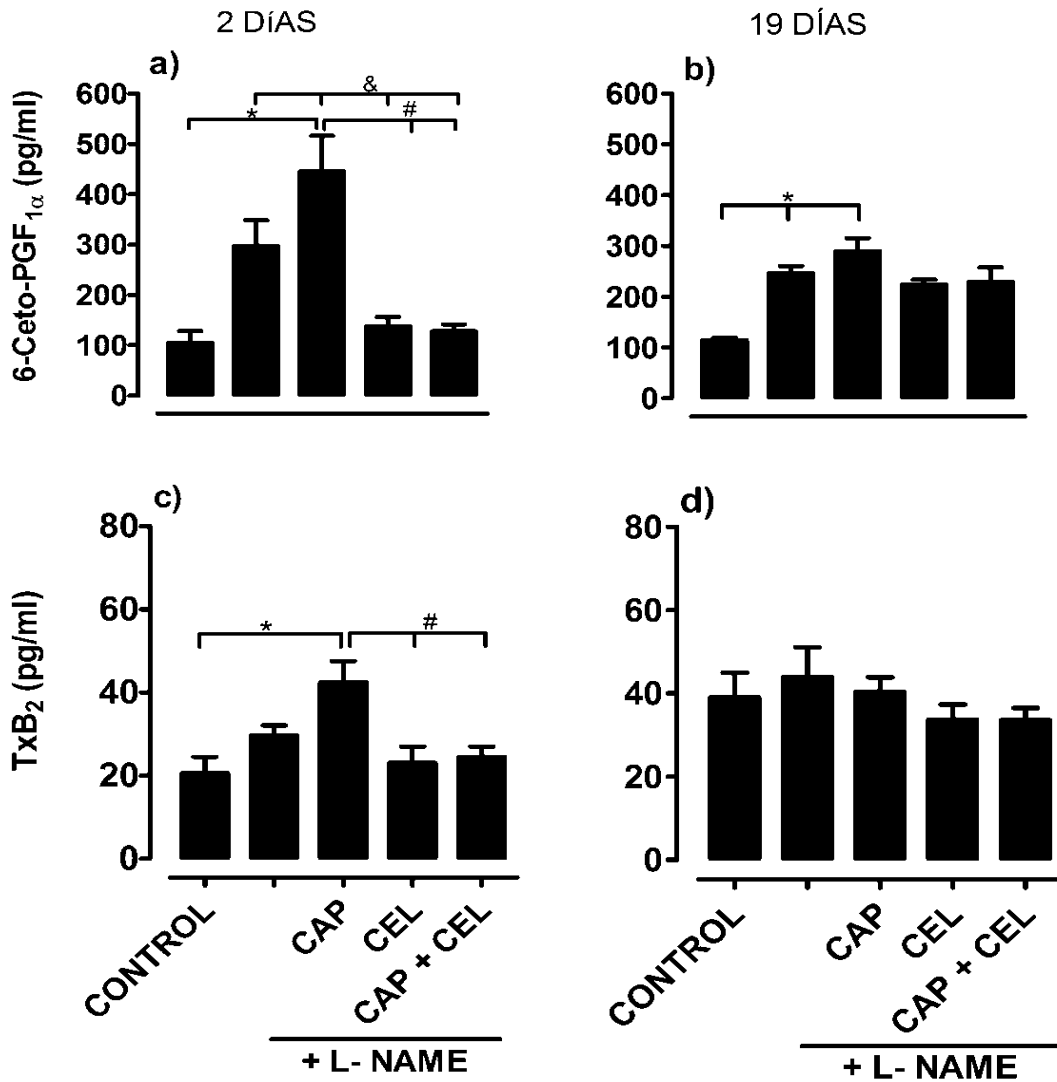


Figura 12.- Concentración renal de 6-ceto-prostaglandina F<sub>1α</sub> de ratas tratadas con N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), por a) 2 días; (b) 19 días; y concentración renal de TxB<sub>2</sub> de ratas tratadas con L-NAME por c) 2 días; (d) 19 días. Los valores representan el promedio ± EEM de 6 ratas por grupo. \**P* < 0.05 control vs tratamientos; &*P* < 0.05 L-NAME vs tratamientos; # *P* < 0.05 L-NAME + captopril vs L-NAME + celecoxib y captopril + celecoxib (CAP + CEL).

### 7.10. Efecto de captopril y celecoxib sobre la concentración plasmática de Ang II en ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días

La angiotensina II plasmática se incrementó en los animales tratados con L-NAME con respecto al control ( $107 \pm 24$  vs  $232 \pm 19$  fmol/ml), el tratamiento con L-NAME más captopril, la inhibición de la síntesis de óxido nítrico y el bloqueo de la COX-2 de manera conjunta, así como la combinación de captopril y celecoxib redujeron la Ang II plasmática ( $139 \pm 20$  y  $91 \pm 20$  fmol/ml) comparado con el grupo tratado solo con L-NAME (Fig. 13a).

A los 19 días, la Ang II plasmática en los animales control fue de  $98 \pm 18$  fmol/ml, la inhibición de la sintasa de óxido nítrico incrementó la Ang II ( $179 \pm 13$  fmol/ml). La inhibición de la COX-2 y la combinación de captopril y celecoxib redujeron la concentración de Ang II plasmática ( $70 \pm 6$  y  $50 \pm 6$  fmol/ml) (Fig. 13b). Estos resultados muestran que la COX-2 es capaz de regular el sistema renina angiotensina.

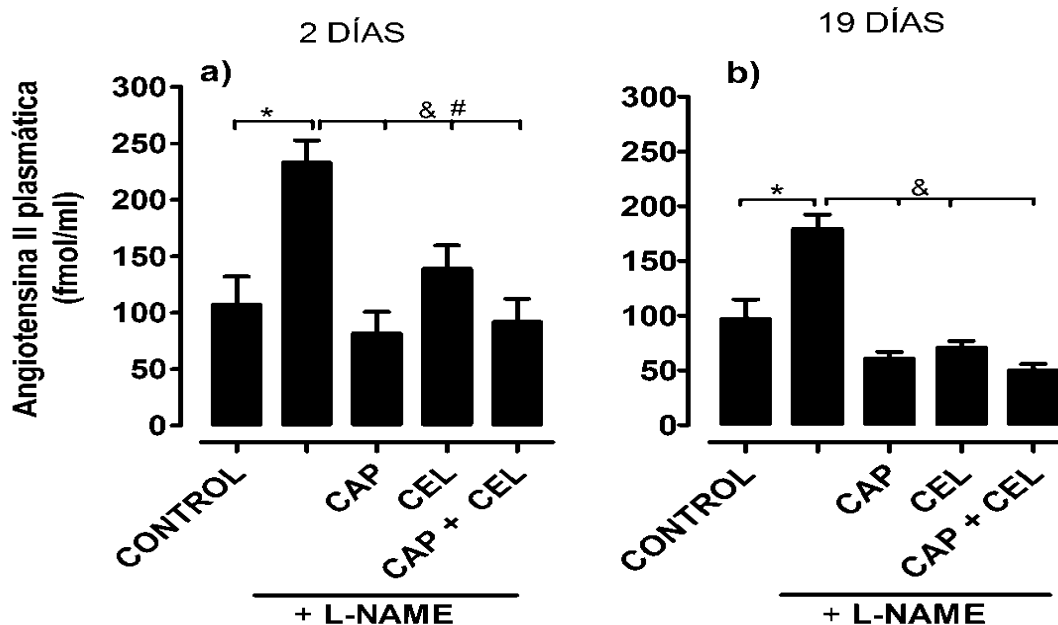


Figura 13.- Efecto de captopril y celecoxib sobre la concentración plasmática de Angiotensina II en ratas tratadas con N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME) por: a) 2 días, (b) 19 días. Los valores se representan como el promedio  $\pm$  EEM de 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$  control vs L-NAME; & $P < 0.05$  L-NAME vs tratamientos; # L-NAME + captopril vs celecoxib

## 8.0. DISCUSIÓN

### 8.1. Hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico

En este trabajo usamos el modelo de hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico, a través de la administración de un análogo de la L-arginina, el N<sup>W</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), el cual es un inhibidor reversible de la sintasa de óxido nítrico (Bogle y col., 1992). En general, la sustitución del grupo guanidino de la L-arginina produce compuestos que son potentes inhibidores de la NOS *in vivo* e *in vitro*. Con base en estudios funcionales y moleculares, el L-NAME muestra mayor afinidad por nNOS>eNOS>iNOS (Hobbs y Mills., 1999).

Con base a los trabajos de Arnal y col. (1992), Ribeiro y col. (1992), Kristek y col. (1996) y Mandarim y Lacerda (2001), la dosis de L-NAME de 75 mg/kg que se utilizó en el presente estudio es una dosis alta y por el tiempo (33 días) en el que se dejó evolucionar el modelo, nos permite considerarlo como un modelo de hipertensión arterial de tipo crónico (Rossoni y col., 2007 y Sampaio y col., 2002).

En nuestro trabajo medimos el efecto inhibitor del L-NAME a través de los metabolitos estables del óxido nítrico, los nitritos y nitratos. A partir del segundo día de tratamiento se observó una disminución en la concentración de NO alcanzando el nivel máximo de reducción a partir del día 19 hasta los 33 días de tratamiento, lo cual refleja el efecto máximo inhibitorio del L-NAME sobre la actividad de la NOS (en las ratas control fue  $900 \pm 45 \mu\text{M}$  y para las ratas hipertensas fue  $20 \pm 6 \mu\text{M}$ ), patrón similar a lo reportado por otros autores. Rossoni y col., (2007) quienes administraron L-NAME (40mg/kg/día) por 4 semanas encontraron valores similares de nitratos/nitritos urinarios (para el grupo control fue de  $403 \mu\text{M}$  y se redujo a  $185 \mu\text{M}$  en las ratas hipertensas), Baylis (1992) administrando diferentes dosis de L-NAME (5-100 mg/kg durante 2 meses),

también observó disminución en la concentración de nitritos/nitratos urinarios de 16 a 4  $\mu\text{mol/ml}$ .

Como se muestra en la Fig 5, la PAS en las ratas control se mantuvo normal a lo largo de los 33 días, lo cual refleja la homeostasis cardiovascular que permite que se mantenga constante el tono vasomotor y con ello la presión arterial se mantenga constante. Dentro de los mecanismos que participan en la regulación de la presión arterial se encuentran: el sistema nervioso simpático, el SRA-A, y sustancias vasodilatadoras (NO, bradicinina, histamina, acetilcolina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio) (Lamas y col., 2012).

En las ratas hipertensas por L-NAME, a partir del segundo y hasta el día 4, la disminución de NO se asoció con un incremento rápido de la presión arterial de 40 mmHg, posteriormente se mantiene disminuida la concentración de óxido nítrico hasta los 33 días de tratamiento, lo que trae consigo que aumente el efecto de las sustancias vasoconstrictoras como las catecolaminas (Lohmeier y col., 2005), endotelina y la Ang II que contribuyen al mantenimiento de la resistencia periférica elevada. Al respecto, Ribeiro y col., (1992) mostraron aumento del efecto vasoconstrictor de Ang II, ya que cuando bloquearon el receptor  $\text{AT}_1\text{R}$  con losartán y, de manera conjunta, también bloquearon los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, el descenso de la presión arterial era mayor cuando se inhibía solo  $\text{AT}_1\text{R}$ , sugiriendo que en la fase de mantenimiento de la HTA está modulada por la activación del sistema renina- angiotensina y por el sistema nervioso simpático.

## **8.2. Expresión de la COX-2 renal de ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

Como se mencionó, la inhibición de la síntesis de NO se asoció con el incremento rápido de la HTA y el establecimiento de otros mecanismos, en particular, en este trabajo nos preguntamos ¿qué pasaría con la expresión de la COX-2 y de renina durante la ausencia de NO?.

En las ratas hipertensas tras la inhibición de la síntesis de óxido nítrico se incremento la expresión del RNAm de COX-2 a partir de día 1 hasta el día 25, por lo que una posible explicación podría ser:

La inhibición de la síntesis de óxido nítrico causa vasoconstricción generalizada y en particular en el riñón en la arteriola aferente, esta vasoconstricción causa una disminución del flujo sanguíneo y de la tasa de filtración glomerular (Baylis y col.,1996), lo que aumenta la reabsorción de NaCl en el túbulo proximal (Bachmann y Mundel., 1994) y llega menor cantidad de NaCl hacia la mácula densa que a su vez es sentido por el NKCC2 como una caída en la concentración de NaCl hacia el interior de las células de la mácula densa por lo que rápidamente es fosforilada la MAP cinasa P38 y a su vez induce a que se activen factores de transcripción que forman complejos inactivos, en particular el factor nuclear NF- $\kappa$ B se trasloca del citosol al núcleo y se une a la región promotora del gene de COX-2 para inducir su transcripción (Harris y col., 1994; Cheng y col., 2000; Schnermann y col., 2001).

Otra explicación es que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico genera la producción de especies reactivas de oxígeno. En particular el anion superoxido puede activar al NF- $\kappa$ B para inducir la transcripción del gene de COX-2 (Kopkan y col., 2005).

### **8.3. Expresión de renina renal de ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

Tras la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, se observó un aumento en la expresión del RNAm de renina, por lo que una posible explicación de este efecto podría ser debido a que el óxido nítrico a través de la actividad de las fosfodiesterasas en particular la fosfodiesterasa 3 que inhibe la expresión de renina (Kurtz y col., 2011). La fosfodiesterasa 3 es responsable de degradar el AMPc que es indispensable para que se inicie la vía de señalización de inducción de la expresión del RNAm de renina, ya que el AMPc fosforila a la proteína cinasa A, que su vez fosforila a un elemento de respuesta al AMPc llamado CREB. CREB se une a la región promotora del gen de renina para que continúe su transcripción (Kurtz y col., 2011).

Hacia el final del tratamiento, una explicación del por qué disminuye la expresión del RNAm de renina hasta normalizarse, podría ser debido a la inducción vías de señalización que tienen que ver con cambios estructurales en los vasos sanguíneos como la hipertrofia, glomeruloesclerosis que son mediados principalmente por Ang II, por lo que puede ejercer un efecto de retroalimentación negativo sobre la expresión de renina (Nabel y col. 1999; Kammerl y col., 2002).

#### **8.4. Participación de la prostaciclina y el tromboxano en la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

Para determinar si durante el desarrollo de la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico participan las COXs, se cuantificaron prostaciclina y tromboxano A<sub>2</sub>. Se encontró que en las ratas hipertensas por inhibición de la síntesis de óxido nítrico, a los 2 días se incrementó la prostaciclina. Este efecto podría ser debido a un mecanismo compensatorio que se activa ante la vasoconstricción renal derivado de la falta de óxido nítrico, (Beierwaltes y col. 2001). Otros autores (Wang y col., 1999; Mann y col., 2001) han sugerido que este efecto podría ser debido a una disminución en la presión de perfusión y para restablecer el flujo sanguíneo renal se sintetizan mayor cantidad de sustancias vasodilatadoras.

Otro componente importante es el estrés de rozamiento que puede influir en una variedad de funciones en las células endoteliales, incluyendo la producción de mediadores vasoactivos (Bhagyalakshmi y Frangos, 1989; Kuchan y Frangos, 1993) y activación de factores de transcripción (Hsieh y col., 1993; Lan y col., 1994).

Aunque el mecanismo por el cual ocurre este efecto aún no se ha descrito del todo, hay evidencia de que el estrés de rozamiento activa la fosfolipasa C (PLC) con la consecuente liberación de diacilglicerol (DAG) y de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) por lo que puede conducir a la liberación de Ca<sup>++</sup> intracelular de las células. En las células endoteliales la PLC se activa por el estrés de rozamiento (Rosales y Sumpio, 1992; Hsieh y col., 1993), produciendo DAG, seguido por la liberación de ácido araquidónico por una mono-o diacilglicérido lipasa (Whatley y col., 1990). Una segunda posibilidad es la liberación de ácido araquidónico a través de la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica y a través de la actividad de las COXs, sintetizan prostaciclina (Bhagyalakshmi y Frangos, 1989; Grabowski y col., 1985).

En contraste, la producción renal de tromboxano A<sub>2</sub> no se modificó entre ratas control e hipertensas en los diferentes tiempos, este efecto podría ser debido a que cuando se activa la sintasa de prostaciclina utiliza los endoperóxidos precursores del TXA<sub>2</sub> para sintetizar prostaciclina (Himmelstein y Klotman, 1989). Warfod y col., (2006), mostraron que el riñón aislado perfundido en condiciones basales sintetiza principalmente prostanoides vasodilatadores y pequeñas cantidades de TXB<sub>2</sub> son sintetizadas.

#### **8.5. Efecto del celecoxib y del captopril sobre la presión arterial sistólica de ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días**

Para demostrar si existe una relación causa-efecto entre la expresión del RNAm de la COX-2 y del RNAm de renina en la HTA por inhibición de la síntesis de NO, se inhibió la actividad de COX-2 con celecoxib, y se inhibió la ECA con captopril, además de la combinación de fármacos. Todos se administraron en conjunto con el L-NAME, durante 2 y 19 días. Estos tiempos se tomaron en cuenta en base al curso temporal de expresión del RNAm de la COX-2 y de la renina.

Los datos obtenidos indican que captopril previno el aumento de la presión arterial sistólica inducido por el L-NAME; este efecto está asociado con la disminución de Ang II, y es apoyado por otros trabajos (Kohno y col., 1999; Kammerl y col., 2002), quienes utilizando el modelo de HTA renovascular mostraron disminución de la concentración plasmática de Ang II. La prevención de la conversión de Ang I a Ang II trae consigo la activación de otros sistemas vasoactivos como la bradicinina (Mombouli y col., 1992; Unger y Lebrun, 1992) la cual a través de su unión al receptor B<sub>2</sub> y de la liberación de NO produce vasodilatación. Aunque esta vía de señalización se inhibe con la administración de L-NAME, nosotros encontramos que la 6-ceto prostaglandina F<sub>1α</sub> se incrementó en las ratas tratadas con L-NAME más captopril, este efecto podría ser debido a que se estimula la entrada de calcio a la célula endotelial y el calcio



estimula la fosfolipasa A<sub>2</sub>, se libera el ácido araquidónico y posteriormente es hidrolizado por la COX-2 la cual sintetiza prostaciclina (Wtodzimirez y col., 2006). En contraste, la administración de L-NAME más celecoxib después de 2 días de administración previno parcialmente el incremento de la PAS, y este efecto se asoció con la disminución en la concentración plasmática de Ang II, como ha sido observado en otros modelos de HTA como en la estenosis renal, donde se ha mostrado que la inhibición selectiva de COX-2 con SC58236 disminuye la hipertensión, a través de reducir la expresión y la actividad de renina plasmática (Wang y col., 1999).

Estudios clínicos han mostrado que los inhibidores de COX-2 aumentan la presión arterial (Sowers y col., 2005); interesantemente, la mayor incidencia de desarrollo de la hipertensión ha sido observada con rofecoxib en comparación con celecoxib (Solomon y col., 2004; Aw y col., 2005). Zewde y Mattson (2004) mostraron que en aquellos modelos que son dependientes del SRA, la inhibición de COX conduce a un agravamiento de la hipertensión arterial debido a la pérdida del efecto diurético y a la prevalencia del efecto antinatriurético (Cheng y col., 2004). La disminución de la producción de PGI<sub>2</sub> es otro factor importante que predispone a que el paciente hipertenso sea más susceptible a padecer infarto al miocardio (Watson y Rhoades, 2003) debido a que prevalece la agregación plaquetaria y la trombosis arterial. Este efecto ha sido observado bajo condiciones de hipoxia inducida en roedores con hipertensión pulmonar (Pidgeon y col., 2004), similarmente, la inhibición selectiva de COX-2 in vivo disminuye la producción de PGI<sub>2</sub> y aumenta la adhesión plaquetaria (Buerkle y col., 2004), este efecto es debido a que la PGI<sub>2</sub> en las células endoteliales estimula substancialmente a la trombomodulina que es un antiagregario plaquetario natural, cuando se deja de producir, se activa la trombina, promoviendo al desarrollo de la trombosis particularmente en la microvasculatura (Dowd y col., 2001).

En cuanto a la combinación de fármacos captopril + celecoxib, se observó un efecto preventivo parcial sobre la HTA inducida por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico. Un efecto similar se ha observado en otros modelos de HTA como el

de la estenosis renal (Cheng y col., 1999; Boshra y col., 2011), en el cual administraron losartán y celecoxib durante 7 días, o un inhibidor selectivo de la COX-2 como el SC-58236, mostraron también este efecto preventivo sobre la hipertensión arterial. Aunque en el presente trabajo nosotros esperaríamos que este efecto fuera mayor debido a que el captopril normaliza la presión arterial sistólica, sin embargo el celecoxib ya no potencia este efecto debido a que disminuye la producción de prostaciclina, que es un importante vasodilatador y diurético que al dejarse de producir, promueve la retención de sodio y agua (Zewde y Mattson 2004), lo cual va a incrementar el volumen sanguíneo circulante, el gasto cardiaco y la resistencia periférica total, lo que conlleva a que se incremente la presión arterial.

#### **8.6. Efecto del celecoxib y del captopril sobre la expresión de la COX-2 y de la renina de ratas tratadas con L-NAME por 2 y 19 días**

En las ratas tratadas con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, captopril, la expresión del RNAm de la COX-2 se incrementó a los 2 y 19 días, por lo que una explicación de este efecto podría ser: 1) La inhibición de la producción de Ang II. Datos obtenidos en este trabajo muestran que la administración de captopril disminuyó la concentración plasmática de Ang II. Al respecto, datos en la literatura han sugerido que Ang II ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la expresión de la COX-2 y de la renina (Jensen y col., 1996, Cheng y col., 2000, Kovacs y col., 2001); así, al disminuir la concentración plasmática de Ang II se induce a que se incremente la expresión de la COX-2 y de la renina; 2) la enzima convertidora de angiotensina puede inducir la activación de factores de transcripción como el AP-1, y mayor expresión de COX-2. Cuando el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina se une a la enzima, se asocia con la cinasa 2 (CK2), se induce la fosforilación de la serina 1270 en la región carboxilo terminal de la ECA, y esta fosforilación induce a que se active la MAPK cinasa 7 (MKK7), lo que acumula el factor de transcripción c-jun,

el cual al traslocarse al núcleo activa al factor de unión al DNA de COX-2 (AP-1), por lo que probablemente en este estudio ambos mecanismos están contribuyendo a la sobreexpresión de COX-2 y renina, durante el desarrollo de la hipertensión arterial por deficiencia de NO (Fleming y col., 2005).

En presencia de celecoxib o la combinación de celecoxib más captopril la expresión de mRNA de renina no se modificó en las ratas con L-NAME durante 2 y 19 días, aunque todavía no tenemos explicación clara de este efecto podemos hacer las siguientes consideraciones. 1) Existen datos donde la inhibición de COX-2 con SC-58236 o NS-398 (Penning y col., 1997) reduce la expresión del RNAm y la actividad de renina plasmática en ratas con coartación aórtica (Wang y col., 1999) y en ratas adrenalectomizadas (Okumura y col., 2002); este efecto puede ser porque el SC-58236 o NS-398 tienen una vida media de varios días en las ratas, en comparación al celecoxib cuyo efecto máximo es a 1 hora de administración y disminuye después de 4 h; 2) Otro factor importante es la vía de administración, vía oral, por lo que quizá los procesos de distribución, absorción y transformación del celecoxib se realicen más rápidamente, de manera que el efecto resultante sea menor en comparación del SC-58236.

3) Sin embargo, uno supondría entonces que la dosis de celecoxib (1 mg/kg/día) que se utilizó no sea la adecuada para inhibir la expresión RNAm de renina, y que una dosis elevada pudiera tener mejor efecto sobre la expresión de renina, al respecto hay datos que muestran que la dosis de celecoxib de 120 mg/kg/día, no disminuyó la expresión y la actividad de renina plasmática (Mann y col., 2001).

4) Múltiples estudios han mostrado la contribución de los prostanoideos derivados de COX-2 en la síntesis y secreción de renina de las células yuxttaglomerulares. Estudios previos han mostrado que los inhibidores de COX-2 SC-58236 y SC-58125, inhiben el incremento en la expresión y secreción de renina, en contraste al rofecoxib, celecoxib o nimesulida que no muestran efecto sobre la expresión o secreción de renina en respuesta a hipertensión renovascular (Fujino y col., 2004; Hartner y col., 2003; Mann y col., 2001; Richter y col., 2004; Wang y col., 1999). Se

ha sugerido que esta diferencia sorprendente entre los diferentes inhibidores de la COX-2 puede ser debido a una menor accesibilidad de rofecoxib o celecoxib a las células del aparato yuxtaglomerular, que pueden conducir a niveles suficientemente altos de estos fármacos para una inhibición completa de la producción de prostaglandinas locales (Kim y Iwao, 2007).

### **8.7. Efecto del celecoxib y del captopril sobre la síntesis de prostanoides en la hipertensión arterial por inhibición en la síntesis de óxido nítrico**

Durante el desarrollo de la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de NO la producción de PGI<sub>2</sub> se incrementó a los 2 y 19 días, este efecto podría ser debido a la vasoconstricción generalizada o ante la disminución de la presión de perfusión que se produce tras la inhibición de la NOS, que son fuertes estímulos para la inducción de la actividad de las COXs, que pueden rápidamente sintetizar prostanoides vasodilatadores para oponerse al efecto vasoconstrictor de estos estímulos (Nafrialdi y col., 1994; Beierwaltes, 2002). Uno de estos prostanoides es la PGI<sub>2</sub> la cual se sintetiza como mecanismo compensatorio que intenta restablecer el tono vasodilatador ante la inhibición de la NOS (Baylis y col., 1992; Cao y col., 1999; Danielson y Conrad 1996; Henrion y col., 1997; Tomida y col., 2003). Con respecto al tratamiento con L-NAME + captopril la producción de prostaciclina se incrementó a los 2 y 19 días, puede ser explicado por 1) la inhibición de la formación de Ang II a través de la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, trae consigo que otros péptidos como la bradicinina no sean degradados, pero al estar inhibida la vía del NO, comienza a entrar mayor cantidad de calcio a la célula endotelial (Busse y Lamontage, 1991) por lo que se incrementa la concentración intracelular. Esto activa a la PLA<sub>2</sub> que libera al ácido araquidónico de la membrana celular (Wiemer y col., 1991) que posteriormente será captado por COX-2 principalmente para sintetizar prostanoides vasodilatadores. Gryglewski y col en el 2003 y 2005 mostraron que la administración de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina induce

el aumento en la expresión y en la actividad de la COX-2, la cual va a sintetizar principalmente prostanoïdes vasodilatadores, como la prostaciclina.

Con respecto al tratamiento con L-NAME + celecoxib a los 2 días la producción de PGI<sub>2</sub> se redujo, este resultado sugiere que el incremento en la producción de PGI<sub>2</sub> observado en las ratas tratadas solo con L-NAME y L-NAME + captopril es derivado principalmente de la producción de COX-2 y no de COX-1, como ha sido mostrado por otros autores (Tomida y col., 2003; Fujino y col., 2004; Bohsra y col., 2011).

En el riñón perfundido aislado de ratas tratadas con L-NAME mas celecoxib por 19 días, no se observó disminución de la producción de prostaciclina, en comparación con las ratas tratadas solo con L-NAME, este efecto podría ser debido a que el tratamiento prolongado con inhibidores de la COX-2 induce a que se exprese el gene de la COX-2 por lo que la dosis utilizada ya no es suficiente para inhibir la síntesis de prostaglandinas (Hoecherl y col., 2002).

Otros estudios han mostrado que la vida media del celecoxib es de 4 h (Mann y col., 2001) y por tanto no se acumula en el organismo, sin embargo uno esperaría que al incrementar la dosis de celecoxib el efecto fuera mayor, al respecto (Mann y col., 2001) administraron dosis de celecoxib de 20 y 120 mg/kg a ratas hipertensas por estenosis renal y mostraron que la actividad de la COX-2 no se reduce.

## **8.8. Efecto de celecoxib y captopril sobre la expresión de angiotensina II plasmática en la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

En el presente estudio mostramos que la concentración plasmática de Ang II se incrementó durante la fase inicial del desarrollo de la hipertensión arterial por inhibición de la síntesis de NO. De manera similar a lo observado por Guan y col., (1992) utilizando el modelo de HTA renovascular encontraron incremento de Ang II plasmática a los 7 días postcoartación, este efecto puede ser debido a que durante la inhibición de la NOS, hay un incremento del efecto presor de los vasoconstrictores endógenos como Ang II. (Conrad y Whittemore., 1992 y Ito y col., 1991). 2) El NO directamente inhibe la liberación de renina. En este caso, el tratamiento con L-NAME estimula la liberación de renina (Henrich y col., 1988 y Raji, 1993) de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio observamos un aumento del RNAm de renina a partir del día 2, y se correlacionó con la concentración plasmática de Ang II elevada. Sin embargo, varios estudios han mostrado que la administración aguda de L-NAME en dosis presoras se asocia con un decremento en la actividad de renina plasmática y de Ang II (Lahera y col., 1992, Perrson y col., 1993; Sigmon y col., 1992). Este decremento puede, sin embargo, ser prevenido cuando los cambios en la presión de perfusión renal y la actividad  $\beta$  adrenérgica son controlados para permanecer constantes. Los efectos de la inhibición crónica de la NOS sobre la actividad de renina plasmática son también contradictorios. Nosotros encontramos incremento en la concentración plasmática de Ang II tras inhibir durante 19 días la NOS, de manera similar a lo reportado por Verhagen y col. (1999) quienes encontraron este incremento de Ang II plasmática a los 21 días de inhibición de la NOS, sin embargo, existen datos en la literatura que muestran que después de 4 días, 2 semanas o 4 semanas de tratamiento con L-NAME en ratas o perros la actividad de renina plasmática no cambia o aun disminuyó (Arnal y col., 1993; Johnson y Freeman y Johnson.,1992; Manning y col., 1993; Pollock y Polakowski., 1993), por

lo que la concentración plasmática de Ang II puede estar disminuida o sin cambios. Al respecto existen datos en la literatura que muestran que en el riñón hay mayor cantidad de Ang II que en el plasma debido a que en las células renales la Ang II se endocita vía receptor AT1, esta acumulación es prevenida por la administración de losartan (Zou y col., 1996 y Zou y col., 1998).

## 9.0 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye:

- ◆ A partir del día 2 de inhibición de la síntesis de óxido nítrico se establece, una relación temporal entre la expresión cortical renal de la ciclooxigenasa-2 y la renina.
- ◆ A partir del primer día de inhibición de la síntesis de óxido nítrico, se encontró un incremento en la síntesis de prostaciclina.
- ◆ El tratamiento con captopril previno el incremento de la presión arterial sistólica, y este efecto fue asociado con la disminución en la concentración plasmática de Ang II y al incremento en la síntesis de prostaciclina.
- ◆ El tratamiento con L-NAME más celecoxib y L-NAME más captopril y celecoxib, previnieron parcialmente el incremento de la presión arterial sistólica inducido por la deficiencia de óxido nítrico, y este efecto fue asociado con la disminución en la concentración plasmática de Ang II.
- ◆ Estos hallazgos sugieren que la expresión del RNAm de COX-2 cortical renal a los 2 días conduce a un incremento en la formación de prostaciclina, la cual podría estar involucrada en la regulación del sistema renina angiotensina, durante la hipertensión inducida por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, sin embargo, este efecto es de corta duración pues no se observó a los 19 días de tratamiento.



## 10.0 BIBLIOGRAFÍA

Arnal J, Amrani G, Chatellier J and Menard. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. 1992. *Hypertension*. 22:380-387.

Aw TJ, Haas SL, Liew D and Krum H. Meta analysis of cyclooxygenase-2 inhibitors and their effects on blood pressure. 2005. *Arch Inter Med*. 165 (5):490-496.

Bach D and Nguyen C. Effect of flosulide a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on passive heyman nephritis in the rat. 1998. *Kidney Int*. 56(5):1770-8.

Bachmann S and Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. 1994. *Am J Kidney Dis*. 24(1):112-29.

Baylis C, Harton P and Engles K. Endothelial derived relaxing factor control renal hemodynamics in the normal rat kidney. 1996. *J Am Soc Nephrol*. 1:875-881.

Baylis C, Mitruka B and Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. 1992. *J Clin Invest*. 90: 278-281.

Beierwaltes WH. cGMP stimulates renin secretion in vivo by inhibiting phosphodiesterase-3. 2001. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290(6):F1376-8.

Beierwaltes WH. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. 1995. *Am J Physiol*. 269 (1Pt 2):F134-9.

Beierwaltes WH. Cyclooxygenase-2 products compensate for inhibition of nitric oxide regulation of renal perfusion. 2002. *Am J Physiol Renal Physiol*. 283(1): F68-F672.

Bergstrom S, Danielsson H, Samuelson B. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors. 1964. *Biochim Biophys Acta*. 90: 207-210.

Bivol LM, Vagnes OB and Iversen BM. The renal vascular response to ANG II injection is reduced in the nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertension. 2005. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F393-F400.

Bhagyalakshmi A and Frangos JA. Mechanism of shear-induced prostacyclin production in endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Comm*. 158: 31–37.

Bogle RG, Moncada S, Pearson JD and Mann GE. Identification of inhibitors of prostacyclin. 1978. 271: 467-469.

Bolger PM, Eisner GM, ramwell PW, Slotkoff LM: Renal actions of prostacyclin. 1978. *Nature*. 2: 271(5644):467-9.

Bonvalet JP, Pradelles P, and Farman N. Segment al synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. 1987. *Am J Physiol*. 253:F377-F387.

Bosse HM, Böhm R, Resch S and Bachmann S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. 1995. *Am J Physiol*. 269 (6 Pt 2):F793-805.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC and Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. 2004. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287(4):R943-9.

Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, Conzen P, Pohl U and Krötz F. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. 2004. *Circulation*. 5; 110(14):2053-9.

Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, Conzen P, Pohl U and Krötz F. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. 2004. *Circulation*. 5; 10(14):2053-9.

Boshra V, Gehan Abdel Hamid el Wakeel, Manar and Nader. Effect of celecoxib on the antihypertensive effect of losartan in a rat model of renovascular hypertension. 2011. *Can J Physiol Pharmacol*. 89:103-107.

Busse R and Lamontage D. Endothelium derived bradykinin is responsible for the increase in calcium produced by angiotensin- converting enzyme inhibitors in human endothelial cells. 1991. *Namyn schmiedberg. Arch Pharmacol*. 344: 126-129.

Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B and Walter U . Análisis del papel funcional de GMPc dependiente de la proteína quinasa en plaquetas humanas intactas utilizando un activador específico para-8-clorofeniltio-GMPc. 1992. *Biochem Pharmacol*. 43: 591 - 596.

Brater DC. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: focus on cyclooxygenase-2-selective inhibition. 1999. *Am J Med*. 13; 107-112.

Breyer MD and Breyer RM. Prostaglandin E receptors and the kidney. 2000. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279(1):F12-23.

Breyer RM, Li J, Liang X, Wang Q, McCullough L and Andreasson K. Misoprostol, an anti-ulcer agent and PGE2 receptor agonist, protects against cerebral ischemia. 2008. *Neurosci Lett*. 20; 438(2):210-5.

Cain AE and Khalil RA. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. 2002. *Semin Nephrol*. 22: 3–16.

Cao C, Matsumura K, Yamagata K and Watanabe Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. 1999. *Brain Res.* 733: 263-272.

Campean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M and Bachmann S. Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). 2003. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285: F19–F32.

Cao C, Matsumura K, Yamagata K and Watanabe Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. 1999. *Brain Res.* 733: 263-272.

Castrop H, Kammerl M, Jensen BL, Kramer BK and Kurtz A. ciclooxigenasa 2 y neuronal expresión nítrico sintasa de óxido en la corteza renal no son interdependientes en estados de deficiencia de sal. 2000. *Pflügers Arch* 441: 235 - 240.

Castrop H, Lorenz JN, Hansen PB, Friis U, Mizel D, Oppermann M, Jensen BL, Briggs J, Skøtt O and Schnermann J. Contribution of the basolateral isoform of the Na-K-2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC1/BSC2) to reninsecretion. 2005. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(6):F1185-92.

Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A and Schnermann J. Permissive role of nitric in macula densa control of renin secretion. 2004. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286:F848–5.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK. Cox-2 a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. 2002. *Proc natl Acad Sci USA.* 99: 13926-13931.

Chen M, Gavrilova O, Liu J, Xie T, Deng C and Nguyen AT. Alternative Gnas gene products have opposite effects on glucose and lipid metabolism. 2007. Proc Natl Acad Sci USA. 102:7386–91.

Cheng HF, Wang JL and Harris RC . Cyclooxygenase-2 Inhibition Decreases Renin Content and Lowers Blood Pressure in a Model of Renovascular Hypertension. 1999. Hypertension. 34: 96-101.

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA and Harris RC. Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. 2002. J Clin Invest. 106:681–8.

Chun KS and Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. 2004. Biochem Pharmacol. 15; 68(6):1089-100.

Claria J. Cyclooxygenase-2 biology. 2003. Curr Pharm. 9: 2177-2190.

Cok SJ and Acton SJ, Sexton AE, Morrison AR. Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA. 2004. J Biol Chem. 279(9):8196-205.

Conrad K and Whitemore S. NG-monomethyl-L-arginine and nitroarginine potentiate pressor responsiveness of vasoconstrictors in conscious rats. 1992. Am J Physiol. 262: R1137-R1144.

Cowley AW and Franz Volhard. Evolution of the medullipin concept of blood pressure control: a tribute to Eric Muirhead. 2006. J Hypertens. 12(10):S25-34.

Cowley AW and Franz Volhard. Evolution of the medullipin concept of blood pressure control: a tribute to Eric Muirhead. 1994. J Hypertension. 12(10):25-34.

Cristobal P, Pacheco-Alvarez D, Richardson C, Ring AM, Vazquez N, Rafiqi FH, Chari D, Kahle KT, Leng Q, Bobadilla NA, Hebert SC, Alessi DR, Lifton RP, Gamba G. Angiotensin II signaling increases activity of the renal Na-Cl cotransporter through a WNK4-SPAK-dependent pathway. 2009. Proc Natl Acad Sci U S A. 17;106(11):4384-9.

Daniel JL, Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. 2002. Biochem J. 1;368(Pt 2):535-43.

Danielson LA and Conrad KP. Prostaglandins maintain renal vasodilation and hyperfiltration during chronic nitric oxide synthase blockade in conscious pregnant rats. 1996. Circ Res. 79(6):1161-6.

Dean JL, Brook M, Clark AR and Saklatvala J. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. 1999. J Biol Chem. 274(1):264-9.

Dennis MJ, Dixon BS. Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. 1997. Am J Physiol. 273(1 Pt 1):C7-20.

Di Mari JF, Saada JI, Mifflin RC, Valentich JD and Powell DW. HETEs enhance IL-mediated COX-2 expression via augmentation of message stability in human colonic myofibroblasts. 2007. Am J Physiol Gastro intest Liver Physiol. 293(4):G719-28.

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. 2000. J Biol Chem. 21; 275(16):11750-7.

Dowd NP, Scully M, Adderley SR, Cunningham AJ and Fitzgerald DJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. 2001. *J Clin Invest.* 108(4):585-90.

Doller A, Huwiler A, Muller R, Radeke HH, Pfeilschifter J and Eberhardt W. Protein kinase C alpha- dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. 2007. *Mol Biol Cell.* 18(6):2137-48.

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van De Putte LB. Cyclooxygenase in biology and disease. 1998. *J Faseb.* 12: 1063-1073.

Dulin NO, Alexander LD, Harwalkar S et al. Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998. 95: 8098–8102

Duque J, Díaz-Muñoz MD, Fresno M, Iñiguez MA. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in colon carcinoma cells. *Cell Signal.* 2006.18(8):1262-9.

Edwards RM. Effects of prostaglandins on vasoconstrictor action in isolated renal arterioles. 1985. *Am J Physiol.* 248: 779-784.

Ermert L, Ermert M, Althoff A, Merkle M, Grimminger F, and Seeger W. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. 1998. *J Pharmacol Exp Ther.* 286: 1309-1314.

Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function. 2002. *Mol Membr Bio Membr Biol.* 19: 121–136.

Farman N, Pradelles P, and Bonvalet JP. PGE2, PGF2 alpha, 6-keto-PGF1 alpha, and TxB2 synthesis along the rabbit nephron. 1987. *Am J Physiol.* 252: F53-F59.

Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3. 2000. Clin Infect Dis. 31: 202-210.

Fleming I, Kohlstedt K and Busse R. Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. 2005. Hypertension. 45: 126-132.

Fleming EF, Athirakul K, Oliverio MI, Key M, Goulet J, Koller BH and Coffman TM. Urinary concentrating function in mice lacking EP3 receptors for prostaglandin E2. 1998. Am J Physiol. 275(6 Pt 2):F955-61.

Flower RJ and Vane JR. inhibition of prostaglandin synthase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol. 1972. Nature. 240: 410-411.

Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB and Skott O. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. 2002. Circ Res. 90: 996–1003.

Friis UG, Jorgensen F, Andreasen D, Jensen BL and Skott O. Molecular and functional identification of cyclic AMP-sensitive BKCa potassium channels (ZERO variant) and L-type voltage-dependent calcium channels in single rat juxtaglomerular cells. 2003. Circ Res. 93: 213 - 220

Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PB, Svenningsen P, Bie P, Skøtt O, Jensen BL. Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. 2013. Pflugers Arch. 465(1):25-37.

Fujino T, Nakagawa N, Yuhki K, Hara A and Yamada T. Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I<sub>2</sub> receptor IP. 2004. J Clin Invest. 114:805–12.



Garavito RM and Dewitt DL. The cyclooxygenase isoforms structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. 1999. *Biochim Biophys Acta*. 1441: 278-287.

Giles TD, Berk BC, Black HR, Cohn JN, Kostis JB, Izzo JL Jr, Weber MA. Expanding the definition and classification of hypertension. 2005. *J Clin Hypertens*.7(9):505-12.

Goldblatt MW. A depressor substance in seminal fluid. 1933. *J Soc Chem Ind*. 52: 1056-1057.

Goodenough DA, Goliger JA and Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. 1996. *Annu Rev Biochem*. 65: 475–502.

Grabowski EF, Jaffe EA, and Weksler BB. Prostacyclin production in vitro by rabbit aortic endothelium: correction for unstirred diffusional layers. 1985. *J Lab Clin Med*. 105, 36–43.

Grau R, Iñiguez MA and Fresno M. Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta12-14 prostaglandin J2 in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. 2004. *Cancer Res*. 1; 64(15):5162-71.

Greenberg SG, El XR, Schnermann JB and Briggs JP. Efecto del óxido nítrico sobre la secreción de renina. Estudios en células granulares yuxtglomerulares aislados. 1995. *Am J Physiol Renal Physiol*. 268: F948 - F952.

Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A and Schweda F. El paradoxon calcio dependiente de guanilato ciclasa AC5 y AC6. 2006. *Circ Res*. 99: 1197 – 1206.

Gryglewski RJ, Swies J, Uracz W, Chłopicki S and Marcinkiewicz E. Mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor induced thrombolysis in Wistar rats. 2003. *Thromb Res.* 15; 110(5-6):323-9.

Gryglewski RJ, Chłopicki S and Swies J. In vivo endothelial interaction between ACE and COX inhibitors. 2005. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 72(2):129-31.

Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM, Breyer M. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. 1997. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 2):F18-26.

Guan S, Fox j, Kenneth D, Mitchell D and Navar G. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. 1992. *Hypertension.* 20: 763-767.

Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD and Morrison AR. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both C-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. 1998. *J Biol Chem.* 273:28670–6.

Guan Y, Zhang Y, Wu J, Qi Z, Yang G, Dou D, Gao Y, Chen L, Zhang X, Davis LS, Wei M, Fan X, Carmosino M, Hao C, Imig JD, Breyer RM and Breyer MD. Antihypertensive effects of selective prostaglandin E2 receptor subtype 1 targeting. 2007. *J Clin Invest.* 117(9):2496-505.

Guyton AC. Blood pressure control—special role of the kidneys and body fluids. 1991. *Science.* 252: 1813–1816.

Hansen PB and Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. 2003. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285(4):F590-9.

Hao CM, Yull F, Blackwell T, Komhoff M, Davis LS and Breyer MD. Dehydration activates an NF- $\kappa$ B-driven, COX2-dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. 2000. *J Clin Invest.* 106:973–82.

Hao M and Breyer M. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. 2008. *Annu Rev Physiol.* 70:357-377.

Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, Huang PL, Fishman MC, Beierwaltes WH and Carretero OA. Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. 1997. *Hypertension.* 29(1 Pt 2):297-302.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN and Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. 1994. *J Clin Invest.* 94:2504–10.

Harris SI, Kuss M, Hubbard RC, Goldstein JL. Upper gastrointestinal safety evaluation of parecoxib sodium, a new parenteral cyclooxygenase-2-specific inhibitor, compared with ketorolac, naproxen, and placebo. 2001. *Clin Ther.* 23(9):1422-8.

Hartner A, Cordasic N, Goppelt M, Veelken R and Hilgers KF. Role of macula densa cyclooxygenase-2 in renovascular hypertension. 2003. *Am J Physiol Renal Physiol.* 284(3):F498-502.

He XR, Greenberg SG, Briggs JP and Schnermann J. Effects of furosemide and verapamil on the NaCl dependency of macula densa-mediated renin secretion. 1995. *Hypertension.* 26:137–42.

Hecker M, Cheng H, Koffman W. The eicosanoids. Prostaglandins, Thromboxane, Leukotrienes and related compounds. 1995. *Biochim Biophys Acta.* 290-304.

Hemler M and Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. 1976. *J Biol Chem.* 251: 5575-5579.

Henrich WL; Mcallister EH and Smith PB. Guanosine 3,5-cyclic monophosphate as mediator of inhibition of renin release. 1988. *Am J Physiol.* 474-478.

Henrion D, Dechaux E, Dowell F, Maclour F, Samuel SA, Bernard L and Baptise J. Alteration of flow induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2. 1997. *B J Pharmacology.* 121: 83-90.

Himmelstein SI and Klotman PE. The role of thromboxane in two-kidney one clip Golblatt hypertension in rats. 1989. *Am J Physiol.* 257(2 Pt 2): F-190-6.

Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. 89: 7384-7388.

Hobbs RE and Mills RM. Therapeutic potential of nesiritide (recombinant b-type natriuretic peptide) in the treatment of heart failure. 1999. *Expert Opin Investig Drugs.* 8(7):1063-72.

Hoehlerl, Kammerl MC, Schumacher K. Endemann D, Grobecker Hf and Kurtz A. Role of prostanoids in regulation of the renin- angiotensin-aldosterone system by salt intake. 2002. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283: F294-F301.

Howard LL, Patterson ME, Mullins JJ and Mitchell KD. Salt-sensitive hypertension develops after transient induction of ANG II-dependent hypertension in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats. 2005. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F810-F815.

Hsieh HJ, Li NQ, and Frangos JA. Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells. 1993. *J Cell Physiol.* 154, 143-151.

Irvine RF. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells. *Biochem.* 1982. 204: 3-16.

Ito S, Johnson CS and Carretero O. Modulation of angiotensin II vasoconstriction by endothelium derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. 1991. *J Clin Invest.* 87:1656-1663.

Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, and Samuelsson B. identification of human prostaglandin synthase: a microsomal, glutathione dependent enzyme, constituting a potential novel drug target. 1999. *Proc natl acad Sci USA.* 96: 7220-7225.

Jensen BL and Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. 1997. *Kidney Int.* 52:1242–1249.

Jensen BL, Lehle U, Muller M, Wagner C and Kurtz A. Interleukin- 1 inhibits renin gene expression in As4.1 cells but not in native juxtaglomerular cells. 1996. *Pflugers Arch.* 436: 673–678.

Johnson R and Freeman H. Sustained hypertension in the rat induced by chronic blockade of nitric oxide production. 1992. *Am J Hypertens.* 5:919-922.

Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. 1993. 268:9049-9054.

Kammerl MC, Nusing RM, Seyberth HW, Riegger GA, Kurtz A and Kramer BK. Inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates urinaryprostanoid excretion without affecting renal renin expression. 2002. *PflugersArch.* 442: 842-847.

Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. 1996. *Gastroenterology.* 111: 445-454.

Krattinger N, Alonso F, Capponi A, Mazzolai L, Nicod P and Meda P. Increased expression of renal cyclooxygenase-2 and neuronal nitric oxide synthase in hypertensive Cx40-deficient mice. 2009. *J Vasc Res.* 46:188–98.

Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S et al. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med.* 1999. 5: 217–220.

Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, and Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal anti-inflammatory drug-related nephrotoxicity. 1998. *Toxicol Pathol.* 26: 612-620.

Kim S and Iwao H. Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling. 2007. *J Pharmacol Sci.* 91(3):177-81.

Klein T, Shephard P, Kleinert H and Kömhoff M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. 2007. *Biochim Biophys Acta.* 1773(11):1605-18.

Kohno M, Yokokawa K, Minami M, Yasunari K, Maeda K, Kano H, Hanehira T, and Yoshikawa J. 1999. Plasma levels of nitric oxide and related vasoactive factors following long-term treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with essential hypertension. *Metabolism.* 48(10): 1256-1259.

Kömhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. 1997. *Am J Physiol.* 72(4 Pt 2):F460-8.

Kömhoff M, Wang JL, Cheng HF, Langenbach R, McKanna JA, Harris RC and Breyer MD. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. 2000. *Kidney Int.* 57(2):414-22.

Kopkan L, Dewan SA and Majid. Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. 2005. *Hypertension*. 46 (21):1026-1031.

Kozak KR, Rowlinson SW; Marnett LJ. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glycerol prostaglandins by cyclooxygenase-2. 2000. *J Biol Chem*. 275: 33744-33749.

Kovács G, Peti-peterdi J, Rosivall L and Bell PD. Angiotensin II directly stimulates macula densa Na-2Cl-K cotransport via apical AT (1) receptors. 2001. *Am J Physiol Renal Physiol*. 282 (2):F301-6.

Kristek F, Gerová M, Devát L and Varga I. Remodelling of septal branch of coronary artery and carotid artery in L-NAME treated rats. 1996. *Physiol Res*. 45(4):329-33.

Kuchan MJ and Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. 1993. *Am J Physiol*. 264: H150–H156.

Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible RNAm from swiss 3T3, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. 1991. *J Biol Chem*. 266: 12866-12872.

Kujubu WE, Andreasson KI, Isakson PC, Worley PF. Cyclooxygenases and the central nervous system. 1997. *Prostaglandins*. 54(3):601-24

Kurtz L, Gerl M, Kriz W, Wagner C and Kurtz A. Sustitución de la conexina 40 por conexina 45 causas de localización ectópica de las células productoras de renina en el riñón, pero mantiene el control in vivo de la expresión del gen de la renina. 2009. *Am J Physiol Renal Physiol*. 297: F403 - F409.

Kurtz A, Schweda F, schenermman J . Regulation of renin release by local and systemic factors. 2011. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 161:1-44.

Kurtz A and Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion.1998. Am J Physiol. 275(6 Pt 2):F849-62.

Lahera V, Navarro J, Cachofeiro, Oarcia J and Ruilope LM. Nitric oxide the kidney and hypertension. 1992. Am J Hypertens. 10: 129-140.

Lamas B, Vergnaud J, Goncalves N, Perche O, Rossary A, Vasson MP and Farges MC. Altered functions of natural killer cells in response to L-Arginine availability. 2012. Cell Immunol. 280(2):182-90.

Lan Q, Mercurius KO, and Davies PF. Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. 1994. Biochem Biophys Res Comm. 201; 950–956.

Larson D and Anggard T. The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. 1973. Perfusion.15 (2):97-104.

Lim H, Dey SK. PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. 2000. Trends Endocrinol Metab. 11: 137–142

Lohmeier TE, Hildebrandt DA, Warren S, May PJ and Cunningham JT. Recent insights in to the interactions between the baroreflex and the kidneys in hypertension. 2005. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 288(4):R828-36.

Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G and Bidani A. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. 2006. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 290: R1153–R1167.



McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA and Fitzgerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase: the human pharmacology of selective inhibitor of COX-2. 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 272:277-280.

Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin synthase during lipopolysaccharide induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. 2001. *J Biol Chem*. 276:4469-4475.

Mandarin and Lacerda CA, Pereira LM. Renal cortical remodelling by NO-synthesis blockers in rats is prevented by angiotensin-converting enzyme inhibitor and calcium channel blocker. 2001. *J Cell Mol Med*. 5(3):276-83.

Mann B, Harther A, Boye L, Jensen F, Hilgers, Hoehel K, Bernhard K, Kramer and Kurtz A. Acute upregulation of COX-2 by renal stenosis. 2001. *Am J of Physiology*. 280 (1): F119-F125.

Manning R, Mizelle H, and Granger J. Role of nitric oxide in long-term angiotensin II induced renal vasoconstriction. 1993. *Hypertension*. 21:949-955.

Mason RT, Coghlan JP, Denton DA, Fei DW, Scoggins BA and Whitworth JA. Haemodynamic and renin responses to prostacyclin infusion in Na depleted and Na restricted sheep. 1984. *Prostaglandins*. 27: 527-534.

Mattix HJ, Badr KF. Arachidonic acid metabolites and the kidney. In: Brenner BM and Rector FC, 2000. eds. *The Kidney*. Philadelphia: Saunders, chapter 756.

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthase from bovine vesicular gland microsomes. 1976. *J Biol Chem*. 251: 2629-2636.

Mombouli JV, Iliano S, Nagao T, Scott-burden T and Vanhoutte P. Potentiation of endothelium- dependent relaxation to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. 1992. *Circ Res.* 71: 137-144.

Morta RS, Underwood MJ, Brack MJ, Pringle S, de Bono DP and Gershlic AH. A targeted antithrombotic conjugate with antiplatelet and fibrinolytic properties which reduces in vivo thrombus formation. 2002. *Cardiovasc Res.* 27(12):2200-4.

Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. 2002. *Prostaglandins Other lipid mediat.* 68-69:165-175.

Murphy Rc. *Prostaglandins in clinical practice.* 1989. New York. Raven Press. 1-20.

Murakami m and Kudo i. recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E<sub>2</sub>- biosynthetic pathway. 2004. *Pro Lip res.* 43:3-35.

Nabel C, Schweda F, Riegger G-A, Kramer B-K and Kurtz A. Chloride channel blockers attenuate the inhibition of renin secretion by angiotensin II. 1999. *Pflugers Arch.* 438(5): 694-699.

Nafrialdi N, Jover B and Mimran A. Endogenous vasoactive systems and the pressor effect of acute N omega-nitro-L-arginine methyl ester administration. 1994. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23(5):765-71.

Narumiya S and Fitzgerald GA: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. 2001. *J Clin Invest.* 108: 25-30.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD and Mitchell KD. Renal actions of angiotensin II at AT<sub>1</sub> receptor blockers. In: *Angiotensin II Receptor Antagonists,*

2000. edited by Epstein M, Brunner HR, editors. Philadelphia: Hanley y Belfus. 189–214.

Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM and Mitchell KD. and Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. 1996. *Physiol Rev.*76: 425–536

Navar LG, Kobori H, Katsurada A, Miyata K, Ohashi N, Satou R, Saito T, Hagiwara Y, Miyashita K, Determination of plasma and urinary angiotensinogen levels in rodents by newly developed ELISA. 2008. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294(5):F1257-63.

Ohki S, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Prostaglandin hydroperoxidase, and integral part of prostaglandin endoperoxide synthase from bovine vesicular gland microsomes. 1979. *J Biol Chem.* 254: 829-836.

Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T and Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. 2000. *Hypertension.* 35: 68-75.

Okumura T, Hayashi I, Ikezawa T, Yamanaka M, Takata T, Fujita Y, Saigenji K, Yamashina S and Majima M. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate increased blood pressure in renovascular hypertensive models, but not in deoxycorticosterone-salt hypertension. 2002. *Hypertens Res.* 25(6):927-38.

Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW and Lefkowitz RJ. Phosphorylation of the type AT1 Angiotensin receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. 2006. *J Biol Chem.* 271:13266-13272.

Pairet M and Engelhardt G. Distinct isoforms COX-1 and COX-2 of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. 1996. *Fundam Clin Pharmacol*. 10: 1-17.

Paliege, A, Mizel D, Medina C, Pasumarthy A, Huang yg, Bachmann S, Briggs JP, Schnermann JB and Yang T. Inhibition of nNOS expression in the macula densa by COX-2 derived prostaglandin E2. 2004. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287: F152-F159.

Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, Anderson GD, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY and Isakson PC. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). 1997. *J Med Chem*. 40: 1347–1365.

Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR and Nafz B. Endothelium-derived NO stimulates pressure-dependent renin release in conscious dogs. 1993. *Am J Physiol*. 264:F943–7.

Pidgeon GP, Tamosiuniene R, Chen G, Leonard I, Belton O, Bradford A and Fitzgerald DJ. Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: regulation by cyclooxygenase-2. 2004. *Circulation*. 26; 110(17):2701-7.

Pollock D and Polakowski B. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. 1993. *Hypertension*. 21:660-666.

Qi Z, Hao CM, Langenbach RI, Breyer RM, Redha R, Morrow JD and Breyer MD. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. 2002. *J Clin Invest* 110: 61-69.

Raj L. Nitric oxide and the kidney. 1993. *Circulation*. 87(4): V26-V29.

Randall D, King JN, Dawson J, Esser RE, Fujimoto R, Kimble EF, Maniara W, Marshall PJ, O Byme L, Quadros E, Toutain PL and Lees P. Preclinical pharmacology of robecoxib a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. 2009. *J Vet Pharmacol Ther*. 32 (1):1-17.

Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM and Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. 1992. *Hypertension*. 20(3):298-303.

Richter CM, Godes M, Wagner C, Maser-Gluth C, Herzfeld S, Dorn M, Priem F, Slowinski T, Bauer C, Schneider W, Neumayer HH, Kurtz A and Hofer B. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. 2004. *J Hypertens*. 22(1):191-8.

Rodriguez F, Llinas MT, Gonzalez JD, Rivera J and Salazar FJ. Renal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake. 2000. *Hypertension*. 36: 276-281.

Ros J, Clària J, Jiménez W, Bosch-Marcé M, Ange li P, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Role of nitric oxide and prostacyclin in the control of renal perfusion in experimental cirrhosis. 1995. *Hepatology*, 22; 915-920.

Rosales OR and Sumpio BE. Protein kinase C is a mediator of the adaptation of vascular endothelial cells to cyclic strain in vitro. 1992. *Surgery*. 112: 459-466.

Rossoni G, Manfredi B, De Gennaro Colonna V, Berti M, Guazzi M and Berti F. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. 2007. *J Br Pharmacol*. 150(5):567-76.

Saito O, Guan Y, Qi Z et al. Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003. 284: F1164–F1170.

Sampaio RC, Tanus-Santos JE, Melo SE, Hyslop S, Franchini KG and Luca IM. Hypertension plus diabetes mimics the cardiomyopathy induced by nitric oxide inhibition in rats. 2002. *Chest*.122(4):1412-20.

Schlondorff D. Renal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. 1993. *Kidney Int*. 44(3):643-53.

Schnermann J. Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. 2001. *Nephrol Dial Transplant*. 16(9):1735-8.

Schricker K, Holmer S, Kramer KB, Riegger G and Kurtz A. Control of renin gene expression in 2 kidney-1 clip rats. 1995. *Kidney int*. 46: 1539-1541.

Schricker K, Pötzl B, Hamann M and Kurtz A. Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. 1996. *Pflugers Arch*. 432(3):394-400

Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC and Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12; 93(23):13176-81.

Secretaria de Salud. En cuesta nacional de salud y nutrición. 2012.

Sigmon D, Carretero A and Beierwaltes WH. endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo. 1992. *Am J physiol*. 263: F256-F261

Simmons DL, Botting RM, Hla T. cyclooxygenase isozymes. The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. 2004. *Pharmacol Rev*. 56:387-437.

Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P and Smart A, Schnermann J and Briggs JP. Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. 1996. *Am J Physiol.* 270: F1027-37.

Stock JL, Shinjo K, Burkhardt J, Roach M, Taniguchi K, Ishikawa T, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, McNeish JD and Audoly LP. The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. 2001. *J Clin Invest.* 107(3):325-31.

Smith WL, and Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and 2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002. 68. 115-128.

Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. 2001. *J. Clin Invest.* 107: 1491–1495.

Solomon DH, Schneeweiss S, Levin R and Avorn J. relationship between COX-2 specific inhibitors and hypertension. 2004. *Hypertension.* 44(2):140-145.

Sowers JR, White WB, Pitt B, Whelton A, Simon LS and Winer N. Celecoxib rofecoxib efficacy and safety in comorbidities evaluation trial investigators. 2005. *Arch Inter Med.* 165(2):161-168.

Spencer AG, Woods JW, arakawa T, singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and 2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem.* 1998. 273: 9886-9893.

Tanabe T and tohnai N. cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. 2002. *Prostaglandins other Lipid Mediat.* 68-69: 95-114.

Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, murakami M, and Kudo i. molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with

cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. 2000. J Biol chem. 275: 32775-32782.

Traynor TR, Smart A, Briggs JO, Schnermann JB. Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. 1999. Am J Physiol renal physiol. 277: 706-710.

Tomida T, Numaguchi Y, Nishimoto Y, Tsuzuki M, Hayashi Y, Imai H, Matsui H, and Okumura K. Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF<sub>2</sub> formation in L-NAME-treated rats. 2003. J Hypertens. 21(3):601-9.

Tojo A, Madsen KM and Wilcox CS. Expression of immunoreactive nitric oxide synthase isoforms in rat kidney. Effects of dietary salt and losartan. 1995. Jpn Heart J.1; 36(3):389-98.

Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M and Margioris AN. Signalling networks, regulating cyclooxygenase-2. 2006. Int J Biochem Cell Biol. 38(10):1654-61.

Unger T and Lebrun CJ. Cardioprotection and converting enzyme inhibition role of bradykinins. 1992. Diabete Metab. 18:161-169.

Vaneckova I, Cahova M, Kramer HJ, Huskova Z, Skaroupkova P, Komers R, Bader M, Ganten D and Cervenka L. Acute effects of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in heterozygous ren-2- transgenic rats on normal or low sodium intake. 2004. Kidney Blood Press Res 27: 203-210.

Verma S, Bhanot S, Yao L and McNeill JH. Vascular insulin resistance in fructose-hypertensive rats. 1997. Eur J Pharmacol.19: 322(2-3):R1-2.

Verhagen AM, Brank B, Boer P, Hermann-Josef, Koomans H and Joles A. Losartan-sensitive renal damage caused by chronic NOS inhibition does not



involve increased renal angiotensin II concentrations. 1999. *Kidney int.* 56: 222-231.

Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, and Masferrer JL. Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. 1997. *Hypertension.* 30; 687-692.

Von Euler US. The specific blood pressure lowering substance in human prostate and seminal vesicle secretion. 1935. *Klim Wochenschr.* 14:11182-1183.

Wagner C, Gödecke A, Ford M, Schnermann J, Schrader J and Kurtz A. Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. 2000. *Pflugers Arch.* 439(5):567-72.

Walter R, Nieberding M and Walter U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. 1987. *Eur J Biochem.* 15; 167(3):441-8.

Wang JL, Cheng HF and Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. SC58236, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor decreases renin release in a model of renovascular hypertension. 1999. *Hypertension.* 34: 96–101.

Ward C, Walker A, Dransfield I, Haslett C, Rossi AG. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. 2004. *Biochem Soc Trans.* 32(Pt3):465-7.

Warford L, Yu C, Shuhyta J, Waketield A, sankaran D, Ogborn M and aukema H. Selectivity of cyclooxygenase isoform activity and prostanoid production in normal and diseased Han: SPRD-cy rat kidneys. 2006. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290: F897-F904.

Watson d.j, Rhoades T and Guess HA. All-cause mortality and vascular events among patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, or no arthritis in the UK general practice research Database. 2003. *J Rheumatol.* 30:1196-1202.

Warner TD and Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. 2004. *J Faseb.*18: 790-804.

Whatley RE, Zimmerman GA, McIntyre T M and Prescott SM. Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells.1990. *Prog Lipid Res.* 29: 45–63.

Wojtaszek PA, Heasley LE, Siriwardana G and Berl T. Dominant-negative c-Jun NH2-terminal kinase 2 sensitizes renal inner medullary collecting duct cells to hypertonicity-induced lethality independent of organic osmolyte transport.1998. *J Biol Chem.* 9; 273(2):800-4.

Wiemer G, Schölkens BA, Becker RH and Busse R. Ramiprilat enhances endothelial autacoids formation by inhibition breakdown of endothelium derived bradykinin. 1991. *Hypertension.*18 (4):558-63.

Wilcox CS and Welch WJ. Thromboxane synthase and TP receptor mRNA in rat kidney and brain: effects of salt intake and ANG II. 2003. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F525-F531.

Włodzimierz B, Kramkowski K and Mogieinick A. Are the endothelial mechanisms of ACE-Is already established. 2006. *Pharmacological Reports.* 58: 126-131.

Xie W and Herschman HR. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. 1996. *J Biol Chem.* 271:31742–8.

Xie WL, chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of mitogen responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by RNAm splicing. 1991. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 2692-2696.

Yamamoto H, Endo T, Kiya T, Goto T, Sagae S, Ito E, Watanabe H and Kudo R. Activation of phospholipase D by prostaglandin F2 alpha in rat luteal cells and effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism. 1995. *Prostaglandins*. 50(4):201-11.

Yang T, Endo Y, Huang YG, Smart AJ, Briggs P and Schnermann J. Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets. 2000. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279:F819–F825.

Yang T, Schnermann JB and Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal medulla by tonicity in vivo and in vitro. 1999. *Am J Physiol*. 277(1 Pt 2):F1-9.

Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB and Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. 1998. *Am J Physiol* 274: F481-F489.

Yao B, Harris RC and Zhang MZ. Intrarenal dopamine attenuates deoxycorticosterone acetate/high salt-induced blood pressure elevation in part through activation of a medullary cyclooxygenase 2 pathway. 2009. *Hypertension*. 54(5):1077-83.

Yokoyama C and Tanabe T. cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. 1989. *Biochem Biophys Res Commun*. 165: 888-894.

Zewde T and Mattson DL. Inhibition of cyclooxygenase-2 in the rat renal medulla leads to sodium sensitive hypertension. 2004. *Hypertension*. 44(4): 424-428.

Zhang Z, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD and DuBois RN. Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 in rat intestinal epithelial cells. *Neoplasia*. 2005. *Proc Natl Acad Sci*. 2(6):523-30.

Zou AP, Wu F and Cowley AW Jr. Protective effect of angiotensin II-induced increase in nitric oxide in the renal medullary circulation. 1998. Hypertension. 31:271-6.

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T and Yazaki Y. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. 1996. J Biol Chem. 271(52):33592-7.

---

**Asunto:** Canadian Journal of Physiology and Pharmacology - Decision on Manuscript ID cjpp-2014-0347.R2

---

**De:** cjpp@nrcresearchpress.com (cjpp@nrcresearchpress.com)

---

**Para:** shponia2000@yahoo.com.mx; villalobos@campus.iztacala.unam.mx; masanchez@gmail.com; leonardodvm65@hotmail.com; gpastelin@aol.com; maxibarrab@hotmail.com; maxibarrab@unam.mx;

---

**Cc:** cjpp@nrcresearchpress.com;

---

**Fecha:** Viernes, 9 de enero, 2015 16:34:23

---

09-Jan-2015

Dear Dr. Ibarra-Barajas,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension." in its current form for publication in the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The Editorial Office will contact the corresponding author about publication.

OpenArticle, an open access option for published research articles, allows individual authors or their funding agencies to sponsor open availability of their articles on the journal Web site for a fee of \$3000. For further information, please see <http://www.nrcresearchpress.com/page/authors/services/openarticle>. If you wish to take advantage of the OpenArticle option, you must submit a completed form (also available on that Web site). You will be billed for the fee upon submission of the completed form.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Drs. Grant Pierce & Donald Smyth  
Editors in Chief, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

\*\*\*\*\*  
Maximize your article's potential!

Download your Author Checklist and take advantage of opportunities to expand the reach of your work, sign up for e-alerts, provide valuable feedback, and more.  
<http://www.cdnsiencepub.com/learning-centre/publishing-technology/Author-Checklist.aspx>

\*\*\*\*\*

Reviewer(s)' Comments to Author:

\*\* If applicable, Reviewer File Attachments may be found in Manuscript Central in your Author Center. Click on "Manuscripts Accepted for First Look". Click on View Decision Letter. Reviewer File

**Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension.**

Elizabeth Alejandrina Gúzman-Hernández, Rafael Villalobos-Molina, María Alicia Sánchez-Mendoza, Leonardo Del Valle-Mondragón, Gustavo Pastelin-Hernández, Maximiliano Ibarra-Barajas

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 10.1139/cjpp-2014-0347

**Abstract**

We investigated the involvement of cyclooxygenase-2 (COX-2) and the renin-angiotensin system in NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-induced hypertension. Male Wistar rats were treated with L-NAME (75 mg/kg/day, in drinking water) for different times (1 to 33 days). COX-2 and renin mRNA was measured by real time-PCR in the renal cortex, and prostanoids were assessed in the renal perfusate, whereas angiotensin II (Ang II) and Ang (1-7) were quantified in plasma. In some rats, nitric oxide synthase inhibition was carried out in conjunction with oral administration of captopril (30 mg/kg/day) or celecoxib (1 mg/kg/day) for 2 or 19 days. We found a parallel increase in renocortical COX-2 and renin mRNA starting at day 2 of treatment with L-NAME, and both peaked at 19-25 days. In addition, L-NAME increased renal 6-Keto-PGF1 $\alpha$  (prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) metabolite) and plasma Ang II from day 2, but reduced plasma Ang (1-7) at day 19. Captopril prevented the increase in blood pressure, which was associated with lower plasma Ang II and increased COX-2-derived 6-Keto-PGF1 $\alpha$  at day 2 and plasma Ang (1-7) at day 19. Celecoxib partially prevented the increase in blood pressure; this effect was associated with a reduction in plasma Ang II. These findings indicate that renal COX-2 expression increased in parallel with renin expression, renal PGI<sub>2</sub> synthesis and plasma Ang II in the L-NAME-induced hypertension.

## Introduction

Prostanoids are important modulators of kidney function, including salt and water balance, vascular tone and renal perfusion. The cyclooxygenases (COXs) are the rate-limiting enzymes in the synthesis of prostanoids (Caughey et al. 2001). COX-1 is constitutively expressed in the smooth muscle and endothelial cells of the renal blood vessels, and in the collecting ducts of the renal medulla and papilla; whereas COX-2 is mainly localized in the *macula densa*, the thick ascending limb of the loop of Henle, and in the interstitial cells of the medulla and papilla (Harris et al. 1994; Khan et al. 1998; Qi et al. 2002). Interestingly, significant interspecies differences exist in the presence and distribution of COX-2 in mammalian kidney (Ichii et al. 2008; Khan et al. 1998).

Studies in rodent kidney indicate that COX-2 activity is an important requirement for renin secretion to different stimuli (Castrop et al. 2001; Harding et al. 1997; Wang et al. 1999). The COX-2-derived prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) stimulate renin gene expression in the juxtaglomerular cells (Friis et al. 2005; Jensen et al. 1996). Consequently, renin secretion can be blocked by specific COX-2 inhibitors (Wang et al. 1999), indicating a tight coordination in the expression of both enzymes.

Nitric oxide (NO) is another modulator of renin expression, which is counteracted by Angiotensin II (Ang II) under physiological conditions (Harris et al. 2000; Schricker et al. 1995). In a variety of conditions, the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and COX-2 is modified in parallel with that of renin (Castrop et al. 2000; Schricker 1996). COX-2 and nNOS are colocalized in the *macula densa*, suggesting that nNOS might be involved in mediating expression of COX-2 or *viceversa* (Bosse et al. 1995; Harris et al.

1994; Mundel et al. 1992; Tojo et al. 1995). In this regard, Kommareddy et al. (2011) proposed that COX-2 expression and nNOS expression are reciprocally regulated in *macula densa* and that in conditions with chronically reduced NO availability, COX-2 is upregulated to compensate for loss NO. In order to define the relative importance of endothelial NOS (eNOS) and nNOS in renin expression and release, Castrop et al. (2004) showed that *macula densa*-dependent renin secretion does not require intact nNOS or eNOS activity but, rather, NO generated by global NOS activity, which acts as a stimulatory factor in renin secretion.

The expression of COX-2 is increased in the kidneys of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-treated mammals; furthermore, the production of PGI<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub> and 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) is also increased, suggesting that prostanoids play an important role in the pathogenesis of L-NAME-induced arterial hypertension and, possibly, in the hyperactivity of the renin-angiotensin system (RAS) (Kommareddy et al. 2011; Tomida et al. 2003). However, COX-2 expression in the kidney cortex and its causal link with changes in renin gene expression, as well as the regulation of the RAS in L-NAME-induced hypertension are unknown. Therefore, we investigated if COX-2 increases renin gene expression and RAS activity in hypertension induced by NO synthesis inhibition.



**Materials and methods.**

**Animals**

Male Wistar rats (250-300 g body weight) were used and maintained under standard laboratory conditions with free access to food and water. All animal procedures were conducted in accordance with the *Federal Regulations for Animal Experimentation and Care* (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México), and were approved by the Institutional Bioethics and Investigation Committee.

**Chronic Nitric Oxide Synthase (NOS) inhibition.**

Rats were randomly assigned to treatment groups. Some animals received vehicle (control) or L-NAME (75 mg/kg/day; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1, 2, 4, 8, 12, 15, 19, 25, 28 and 33 days. In some rats, NOS inhibition was carried out in conjunction with oral administration of captopril (30 mg/kg/day Sigma-Aldrich), or the selective COX-2 inhibitor celecoxib (1 mg/kg/day) or both drugs for 2 or 19 days. All drugs were administered in the drinking water, and the actual doses of each group were calculated from the daily water intake.

**Arterial pressure measurements.**

Systolic arterial blood pressure (SBP) was measured non-invasively using a tail-cuff computer-aided monitoring device (Automatic Blood Pressure Computer, Model LE 5007; Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) as follows. The rat was restrained in a size-

matched plastic container, and a sensor and ring containing inflatable latex were placed on the tail while the rat was kept warm in the same device (37°C). The rats were trained to be inside the container with the cuff placed on the tail and to get used to the inflation and deflation of the latex ring (this was performed several times over a one-week period). To minimize stress-induced variations in blood pressure, all measurements were taken by the same person in the same peaceful environment at the same time of day, the blood pressure measurements were then recorded for each group, and the mean of four measurements obtained in one session was considered as the systolic blood pressure (Castro-Moreno et al. 2012; Zhao et al. 2011).

#### **Measurement of urinary nitrite excretion and creatinine clearance.**

The amount of total nitrite (a NO metabolite) in 24-h urine samples was determined using a commercial kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. The amount of total nitrite was determined by converting nitrate to nitrite, followed by the Griess reaction and colorimetric determination at 540 nm. Urine and serum creatinine concentration was determined colorimetrically at 500 nm, by Jaffe's method, using Biodiagnostic (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), following the manufacturer's instructions. Creatinine clearance (CCr) (ml/min) was calculated using the formula:  $CCr = \text{urine creatinine} \times 24\text{-h urine volume} / \text{serum creatinine} \times 1440$ .

**Determination of COX-2 and renin genes expression in the kidney cortex.**

Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to determine COX-2 and renin expression in the kidney cortex. cDNA was synthesized from the kidney cortex mRNA by reverse transcription, and PCR was performed as described (Chomczynski and Sacchi 1987). COX-2 cDNA, renin cDNA and 18S rRNA were amplified with the following primers: COX-2, 5' GGC TGC GGG AAC ATA ATA GA 3' and 5' AAA AGC TCT GGG TCA AA 3'; renin, 5' GCT ACA TGG AGA ATG GGA CTG AA 3' and 5' ACC ACA TCT TGG CTG AGG AAA 3'; 18S rRNA, 5' GGG AGC CTG AGA AAC GGC 3' and 5' GGG TCG GGA GTG GGG GGG TAA TTT 3' (Boustany et al. 2004; Tomida et al. 2003). The reaction mixture consisted of RNase-free water, SYBR green master mix, 100 nM primers and 1.0  $\mu$ M cDNA. The conditions for the amplification of COX-2 cDNA were as follows: COX-2, 95°C for 10 min, followed by 35 cycles at 60°C for 30 s and 72°C for 30 s; for renin, 94°C for 45 s, followed by 40 cycles at 60°C for 45 s and 72°C for 30 s; 18S rRNA, 95 °C for 10 min, followed by 25 cycles at 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The PCRs were performed in a Rotor Gene thermal cycler (Corbette Research, Sydney, Australia). The relative amounts of COX-2 and renin DNA were normalized to 18S rRNA and calculated from threshold cycle numbers using the  $2^{-\Delta\Delta ct}$  method (Livak and Schmittgen 2001).

**Isolation and perfusion of the rat kidney.**

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), and the right kidney was exposed and prepared for perfusion. Briefly, after midline laparotomy, the right renal artery was cannulated through the mesenteric artery, and the right kidney was removed and perfused with Krebs solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 11.5 mM glucose) at a constant flow rate of 10 ml/min, a pH of 7.4, a temperature of 37°C and in the presence of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

**Measurement of 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> and thromboxane B<sub>2</sub> in the renal perfusate.**

After a 60-min equilibration period, the renal perfusate was collected for the measurement of the stable metabolites of PGI<sub>2</sub> (6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-Keto-PGF<sub>1α</sub>)) and TxA<sub>2</sub> (thromboxane B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>)) as indices of cyclooxygenase activity (D'Abril Ruíz-Leyja et al. 2013). The metabolites were assayed by ELISA using specific and sensitive kits (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). At the end of the experiment, any excess kidney moisture was absorbed with a towel, and the wet weight was recorded to determine the kidney weight/body weight ratio (KW/BW; mg/g).

**Determination of the plasma angiotensin II and angiotensin (1-7) concentration.**

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), and blood samples with heparin (500 UI/ml, Sigma) were obtained via aortic puncture. Samples were

centrifuged at 3500 r.p.m for 10 min at 4°C and the obtained plasmas were incubated with protease inhibitors cocktail (Complete Mini; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to prevent exogenous generation of angiotensins and immediately preserved at -70 °C until use. The plasma was deproteinized with methanol 10:1 (v:v) and centrifuged at 16,000 x g for 10 min at 4°C (Sorvall RC-28S, rotor SS34; DuPont, Newtown, CT, USA). The pellet was discarded, and supernatant was deproteinized by the addition of 5% trichloroacetic acid, homogenized and centrifuged at 16 000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatant was filtered through a 0.22-µm nitrocellulose membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA) and diluted 1:10 with 0.1 M NaOH. The sample (2 ml) was then passed through a Sep-Pak Classic C-18 cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A volume of 100 µL of the final filtered sample was employed for the analysis. Ang II and Ang (1-7) were detected and quantified by capillary zone electrophoresis with UV detection by a photodiode array (PDA) at a wavelength of 200 nm, as described (Tenorio-López et al. 2010). These experiments were performed using a Beckman Coulter P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System equipped with PDA (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) and controlled by means of the P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System software (version 7.0; Beckman Coulter Inc.).

**Statistics.**

The data are reported as the means ± S.E.M. of 5-8 rats per treatment. All statistical analyses were performed using Data Prism 4.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Differences between groups were assessed by two-way ANOVA, followed by *post hoc* Bonferroni's test;  $p < 0.05$  was regarded as significant.

## **Results.**

### **Time-course of urinary excretion of NO metabolites and SBP in L-NAME-treated rats.**

To determine the effect of L-NAME on systemic NOS activity, the urinary excretion of the stable metabolites of NO (nitrate and nitrite) was determined in control and L-NAME-treated rats. L-NAME treatment induced a time-dependent decrease in urinary nitrite excretion, reaching the maximal decrease 8 days after beginning the L-NAME treatment (Fig. 1a). In addition, the decline in the urinary excretion of nitrites persisted until the end of treatment (Fig. 1a). As expected, the chronic NOS inhibition was associated with a progressive rise in the systolic blood pressure, which reached  $184 \pm 7$  mmHg at day 33 compared with the control value of  $113 \pm 7$  mmHg (Fig. 1b).

### **Renocortical COX-2 and renin genes expression in L-NAME-treated rats.**

To study the role of COX-2 and renin in the development of L-NAME-induced hypertension, we quantified COX-2 and renin genes expression in the renal cortex in rats treated with L-NAME for 1 to 33 days. The mRNA levels of COX-2 and renin increased ~35% in the renal cortex of the L-NAME-treated rats by day 2, reaching maximal

expression at 19-25 days (~65%) in comparison with control rats (Fig. 2). Subsequently, the mRNA levels of COX-2 and renin decreased from day 25 to day 33 (Fig. 2).

**Time-course of prostanoids synthesis in the kidney in L-NAME-treated rats.**

To determine if the renal COX activity was modified in the L-NAME-treated rats, the stable metabolites of PGI<sub>2</sub> and TxA<sub>2</sub> were examined in the kidney perfusate. 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> increased after 2 days (L-NAME, 426 ± 54 vs. control, 243 ± 30 pg/ml;  $p < 0.05$ ), 8 days (L-NAME, 132 ± 21 vs. control, 71 ± 8 pg/ml;  $p < 0.05$ ) and 19 days (L-NAME, 186 ± 14 vs. control, 114 ± 8 pg/ml;  $p < 0.05$ ) of L-NAME treatment compared with the control, whereas no difference from the control was observed at 33 days of L-NAME treatment (Fig. 3a). In contrast, the release of TxB<sub>2</sub> from the kidneys was increased at 33 days of L-NAME-treatment compared with the control (52 ± 14 vs. 20 ± 8 pg/ml;  $p < 0.05$ ) (Fig. 3b).

**Effect of captopril and celecoxib treatments on the KW/BW ratio, creatinine clearance and SBP in L-NAME-treated rats.**

The KW/BW ratio was not different between control and L-NAME-treated rats. In addition, the treatments with captopril or celecoxib did not affect the KW/BW ratio (Table 1). As shown in table 1, the creatinine clearance was similar in all groups at day 2. In contrast, the creatinine clearance was significantly reduced in the L-NAME and celecoxib groups compared with control group at day 19 ( $P < 0.05$ ), whereas treatment with captopril normalized creatinine clearance in L-NAME-treated rats.

To determine if the inhibition of COX-2 or RAS prevented the rise in the SBP in L-NAME-treated rats, NOS inhibition was carried out in conjunction with oral administration of captopril or celecoxib. In the L-NAME-treated rats, the SBP was increased compared with the control (L-NAME,  $150 \pm 4$  vs. control,  $104 \pm 4$  mmHg at 2 days and L-NAME,  $166 \pm 3$  vs. control,  $116 \pm 5$  mmHg at 19 days); this increase was prevented by captopril.

Interestingly, the increase in the SBP after chronic NOS inhibition was partially abolished by treatment with celecoxib at 2 days (L-NAME,  $149 \pm 3$  vs. celecoxib,  $135 \pm 4$  mmHg) and 19 days (L-NAME,  $165 \pm 3$  vs. celecoxib,  $148 \pm 3$  mmHg) or celecoxib plus captopril (Fig. 4).

**Effect of captopril and celecoxib treatments on COX-2 and renin genes expression in the kidney cortex from L-NAME-treated rats.**

In a subsequent set of experiments, the role of COX-2 in the regulation of renin gene expression was studied. As expected, L-NAME treatment for 2 or 19 days significantly increased the mRNA levels of COX-2 and renin in the renal cortex compared with the control (~50%, Fig. 5). Interestingly, captopril administration promoted an additional increase in the COX-2 and renin mRNA levels in the renal cortex, in the L-NAME-treated rats compared with the control rats (~80%, Fig. 5). In contrast, celecoxib treatment did not affect the COX-2 or renin genes expression in the renal cortex in the L-NAME-treated rats, but COX-2 inhibition blocked the captopril-induced increases in the COX-2 and renin mRNA levels when both were administered together with L-NAME (Fig. 5)



**Effect of captopril and celecoxib treatments on renal COX-2-derived prostanoids in L-NAME-treated rats.**

To determine the contribution of COX-2-derived prostanoids to L-NAME-induced hypertension, we quantified the renal production of prostanoids after 2 or 19 days of treatment with captopril or celecoxib. At 2 days, we measured  $105 \pm 23$  pg/ml of 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  in the renal perfusate from the control rats, and  $298 \pm 51$  pg/ml in L-NAME-treated rats ( $p < 0.05$ ). Captopril treatment resulted in a higher renal production of 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  in the L-NAME-treated rats ( $445 \pm 71$  pg/ml;  $p < 0.05$  vs. L-NAME). Interestingly, the increased release of 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  induced by L-NAME or captopril was blocked by celecoxib treatment ( $138 \pm 18$  pg/ml) (Fig. 6).

At 19 days, the renal release of 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  in the control rats was  $114 \pm 5$  pg/ml, whereas L-NAME or captopril plus L-NAME markedly increased the release of 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  ( $245 \pm 14$  pg/ml and  $289 \pm 25$  pg/ml, respectively). Compared to these two treatments, the kidneys from the L-NAME-treated rats given celecoxib or captopril plus celecoxib did not show a reduction in 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  release ( $223 \pm 10$  and  $228 \pm 30$  pg/ml, respectively) (Fig. 6). In marked contrast, renal TxB<sub>2</sub> release did not change after the treatment with L-NAME or celecoxib, except for a small increase in the kidneys of the L-NAME plus captopril-treated rats after 2 days (Fig. 6).

**Effect of captopril and celecoxib treatments on the plasma angiotensin II and angiotensin (1-7) level in L-NAME-treated rats.**

Plasma Ang II was significantly increased by the L-NAME treatment, while captopril treatment markedly decreased the plasma Ang II levels in the L-NAME-treated rats (Fig. 7). Interestingly, COX-2 inhibition caused a significant decrease in plasma Ang II but did not modify the effect of captopril on plasma Ang II in the L-NAME-treated rats (Fig. 7). Plasma Ang (1-7) was slightly increased by the L-NAME treatment at day 2, while captopril treatment did not modify the plasma Ang (1-7) levels in the L-NAME-treated rats (Fig. 7c). Interestingly, COX-2 inhibition caused a significant decrease in plasma Ang (1-7) in the L-NAME- or captopril-treated rats (Fig. 7c). In contrast, Plasma Ang (1-7) was significantly decreased by the L-NAME treatment at day 19, while captopril, celecoxib or captopril plus celecoxib treatments markedly increased the plasma Ang (1-7) levels in the L-NAME-treated rats (Fig. 7d).

**Discussion.**

The findings of this study indicate that chronic NO synthesis inhibition was associated with a parallel rise of renal expression of COX-2 and renin genes. In fact, COX-2 and renin mRNA in the renal cortex increased as early as 2 days after L-NAME treatment, and reached a maximal expression at 19-25 days, suggesting a temporal relationship between renocortical expression of COX-2 and renin in L-NAME-induced hypertension. In addition, these changes in renin and COX-2 expression were associated with increased plasma Ang II levels, and the stimulation of renal prostacyclin production. Although, plasma Ang (1-7) concentration was time-dependent with slight increase at day 2 and marked decrease at day 19. Celecoxib administration to L-NAME-treated rats partially prevented the increase in blood pressure; this effect was associated with a reduction in plasma Ang II levels, despite that renal renin expression was not affected. Treatment with captopril prevented the rise in blood pressure caused by L-NAME which was associated with a reduction in plasma Ang II levels and increased vasodilator PGs synthesis. Interestingly, administration of captopril or celecoxib increased plasma Ang (1-7) concentration in L-NAME-treated rats at day 19, suggesting at least part of therapeutic effects may be mediated through endogenous Ang (1-7). This study is, to our knowledge, the first to demonstrate a temporal relationship between the overexpression of renocortical COX-2 and RAS hyperactivity in L-NAME-induced hypertension.

In our study, the administration of the L-arginine analogue L-NAME markedly decreased the systemic synthesis of NO, with a maximum decrease at day 8 that persisted up to day

33; this was apparent since L-NAME treatment induced a time-dependent decrease in urinary nitrites excretion. This effect was associated with a rapid increase in the SBP during the first 4 days of treatment, and subsequently a slow rise in the SBP was present for 33 days. Previous studies have demonstrated that L-NAME-induced hypertension is characterized by generalized vasoconstriction and increased total peripheral resistance, probably due to removal of extremely important vasodilatory system of continuous NO production (Furchgott and Zawadzki 1980; Qiu et al. 1998). An alternate explanation is that the L-NAME-induced hypertension is due to potentiation of the pressor effect or activation of different vasoconstrictor systems (Ibarra et al. 1995, 2006; Joannides et al. 1995; Richard et al. 1995). Among them, sympathetic nervous system, renin-angiotensin system and COX-2-derived vasoconstrictor PGs, which appear to contribute to the maintenance of L-NAME-induced hypertension (Qiu et al. 1994; Ribeiro et al. 1992; Tomida et al. 2003), and endothelin seems to be more important at earlier stage (Qiu et al. 1995; Qiu and Baylis 1999). Our results are in accordance with these reports, indicating that in addition to NO reduction, arterial hypertension was also caused and maintained by other mechanisms, such as the activation of the COX-2 and renin-angiotensin system (Kommareddy et al. 2011; Tomida et al. 2003). COX-2 and renin showed parallel overexpression, which started two days after L-NAME administration until day 25, suggesting that these enzymatic pathways interact during the development of hypertension in L-NAME-treated rats, as has been reported in RAS-dependent renovascular hypertension models (Cheng et al. 1999; Hartner et al. 1998; Wang et al. 1999). This suggestion is supported by the significant increase in

plasma Ang II levels, and in renal prostacyclin synthesis found in L-NAME-treated rats. Furthermore, we observed that in hypertensive animals after L-NAME treatment during 19 days, the levels of Ang (1-7) were considerably decreased compared with normotensive rats. Ang (1-7) formed from Ang II by angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) or from Ang I via neprilysin, which stimulates Mas receptor, having Ang II-AT<sub>1</sub>R opposite actions, such as vasodilation which could amplify the system prostaglandins-bradykinin-nitric oxide (Ferrario 2006; Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011; Santos and Ferreira 2007; Velez et al. 2009). Consistent with our results, Inaba et al. (2011) previously reported that L-NAME promoted downregulation of ACE2 expression and activity in cardiac tissue. In addition, other groups also demonstrated that plasma Ang (1-7) concentration is lower in spontaneously hypertensive rats (Castro-Moreno et al. 2012; Tenorio-López et al. 2010).

Previous studies have shown that acute or chronic systemic NO inhibition produces a large sustained increase in renal vascular resistance and fall in glomerular filtration rate (Qiu et al. 1994, 1995; Qui and Baylis 1999). One possible explanation for the presence of COX-2 overexpression in this model is that when NO synthesis is inhibited, renal arteriolar constriction elicits a decrease in renal blood flow (Baylis et al. 1996; Qiu et al. 1998; Ribeiro et al., 1992), which leads to up-regulation of COX-2 expression (Fig 8b). Similar data have been obtained in renovascular hypertension, i.e., after placing a clip on the unilateral renal artery COX-2 is overexpressed in the first 24 h (Mann et al. 2001). An alternative to the above hypothesis would be that chronic inhibition of NOS elicits up-regulation of COX-2 in the kidney, perhaps to compensate for loss of NO (Beierwaltes

2002; Kommareddy et al. 2011). Thus, increase in COX-2 products may counteract renal arteriolar constriction, protecting renal vasculature from hypoperfusion (Fig 8b). Indeed, we found that NO inhibition was associated with an increase in renal prostacyclin synthesis but not TxA<sub>2</sub> production, the PGI<sub>2</sub>/TxA<sub>2</sub> ratio was increased 3 fold in renal perfusate from L-NAME-treated rats. On the other hand, it has been suggested that PGI<sub>2</sub>, whose production is stimulated by COX-2 in *macula densa*, acts through its IP receptor to induce the expression and release of renin from the juxtaglomerular cells (Friss et al. 2005; Fujino et al. 2004). These findings suggest that increase in PGI<sub>2</sub> could cause the overexpression of renal cortical renin in L-NAME-treated rats. In contrast, L-NAME administration did not modify renal TxA<sub>2</sub> release at any time (except at day 33), suggesting that this prostanoid does not participate in RAS hyperactivity.

The coordinated expression of COX-2 and renin suggests that COX-2 could be involved in mediating expression of renin or *viceversa*. To determine whether COX-2 is involved in RAS regulation in L-NAME-induced hypertension, the selective COX-2 inhibitor celecoxib, the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor captopril, or their combination were administered simultaneously with L-NAME for 2 or 19 days. Interestingly, COX-2 inhibition with celecoxib for 2 days partially prevented the elevation in the SBP and the renal production of PGI<sub>2</sub> induced by L-NAME. These effects were associated with decreased plasma Ang II and Ang (1-7) concentrations, suggesting that COX-2 regulates the RAS through PGI<sub>2</sub> production during the early development of hypertension induced by NO inhibition (Fig 8d). However, celecoxib did not prevent renal

production of PGI<sub>2</sub> at 19 days but decreased plasma Ang II levels and increased plasma Ang (1-7), suggesting that other COX-2-derived prostanoids are also involved in regulation of RAS, or celecoxib action is independent of renal renin and may be related to a systemic effect (Fig 8d). In this regard, Park et al. (2014) recently found that treatment with celecoxib inhibits expression of NFκB, which could restore ACE2 expression and thus the synthesis of Ang (1-7). In any case, this hypothesis needs to be further evaluated.

In the L-NAME-treated rats, the administration of captopril showed an antihypertensive effect, which was associated with a decrease in plasma Ang II. These results support the hypothesis that the antihypertensive effect of captopril is due to a blockade of the physiological effects Ang II (Kammerl et al. 2002; Kohno et al. 1999). Additionally, chronic ACE inhibition increases the circulating levels of Ang (1-7) in L-NAME-treated rats (at day 19), likely due to excess angiotensin I, which is provoked by ACE inhibition with captopril. Previous reports have demonstrated that angiotensin II inhibitors increase the expression of COX-2 and renin in the *macula densa* and juxtaglomerular apparatus, respectively (Cheng et al. 1999; Zhang et al. 2006), which supports our observation that captopril treatment promoted an additional increase in COX-2 and renin expression, and in the renal PGI<sub>2</sub> release compared with rats treated with L-NAME alone (Fig 8c); these effects were decreased in the presence of celecoxib. Taken together, these data support the assumption that COX-2-derived PGI<sub>2</sub> is involved in captopril-induced cortical expression of COX-2 and renin (Gryglewski et al. 2003, 2005; Imig et al. 2003). In contrast, celecoxib treatment did not reduce the renal PGI<sub>2</sub> production in captopril-treated rats for 19 days,

suggesting that the role of COX-2-derived PGI<sub>2</sub> in the renin-angiotensin system regulation is a time-dependent phenomenon in L-NAME-induced hypertension. Angiotensin converting enzyme inhibitors elicits accumulation of bradykinin and related kinins, which in turn stimulate the synthesis of NO and PGI<sub>2</sub> in endothelial cells (De Gennaro Colonna et al. 2002; Linz et al. 1995). When the production of NO is inhibited through the administration of L-NAME, bradykinin binding to B<sub>2</sub> receptor liberates arachidonic acid (AA) of membrane phospholipids, primarily via Ca<sup>2+</sup> induced stimulation of phospholipase A<sub>2</sub> (Gryglewski et al. 2001), and increases COX-2 expression (Imig et al. 2003) and activity, which results in PGI<sub>2</sub> release (Gryglewski et al. 2003, 2005). Alternatively, Ang (1-7) appears to stimulate calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, which in turn *via* MAP kinase activation enhances cPLA<sub>2</sub> activity and releases AA for prostacyclin synthesis (Benter et al. 2011; Muthalif et al. 1998). Interestingly, celecoxib decreased antihypertensive effect of captopril, suggesting that systemic or renal vasodilator prostaglandins production contributes to beneficial effect of captopril on blood pressure and renal homeostasis.

In summary, the present findings demonstrate that inhibition of NO synthesis resulted in the coordinate expression of renocortical COX-2 and renin; this time-dependent interaction between COX-2 and renin appears contribute to the early development of L-NAME-induced hypertension. Chronic celecoxib treatment decreased the plasma Ang II concentration but increased Ang (1-7) circulating in L-NAME treated rats. Thus, the mechanism of cardiovascular action for celecoxib appears to depend in part on its ability to



modify plasma Ang II and Ang (1-7) levels. Further studies will elucidate the mechanisms through which the prolonged inhibition of COX-2 affect the plasma Ang II and Ang (1-7) levels during chronic inhibition of NO synthesis. The captopril decreased plasma Ang II concentration, elicited the up-regulation of COX-2, renin and increased renal PGI<sub>2</sub> and plasma Ang (1-7), which could contribute to antihypertensive effect and in slowing the progression of renal disease. A limitation of this study is that we did not know the source of PGI<sub>2</sub> in the renal perfusate; it is possible that a portion of this metabolite is produced in *macula densa*, the measurement of prostanoids in the renal cortex may explain the involvement of some vasodilator prostaglandins including PGI<sub>2</sub> in regulating RAS in L-NAME-induced hypertension. In addition, we did not determine whether other Ang II (Ang III, Ang IV) or Ang 1-7 (Ang 2-7; Ang 3-7) metabolites may contribute to the Ang II and Ang 1-7 concentrations in the current study.

**Acknowledgments.**

This study was financed by grants 102022 (MIB) from CONACYT, IN223009 (MIB) from PAPIIT, DGAPA, UNAM, and PAPCA (35) 2009-2010 (MIB) from FES-Iztacala, UNAM. The authors acknowledge the excellent technical assistance of M. L. Flores-Sánchez (veterinarian) in caring for the study animals. E.A.G.H. Elizabeth Alejandrina Guzmán Hernández was supported by doctoral fellowships from CONACYT (202693), and Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. RV-M is a Visiting Professor at UACJ, supported in part by a fellowship from PASPA, DGAPA, UNAM.

**References.**

Baylis, C., Slangen, B., Hussain, S., and Weaver, C. 1996. Relationship between basal NO release and cyclooxygenase products in the normal rat kidney. *Am J Physiol.* **271**(5 Pt 2):R1327-34. PMID: 8945971.

Beierwaltes, W.H. 2002. Cyclooxygenase-2 products compensate for inhibition of nitric oxide regulation of renal perfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* **283**(1):F68-72. doi: 10.1152/ajprenal.00364.2001. PMID: 12060588.

Benter, I.F., Yousif, M.H., Al-Saleh, F.M., Raghupathy, R., Chappell, M.C., Diz, D.I. 2011. Angiotensin-(1-7) Blockade Attenuates Captopril- or Hydralazine-Induced Cardiovascular Protection in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *J Cardiovasc Pharmacol.* **57**(5):559–67. doi:10.1097/FJC.0b013e31821324b6. PMID: 21326110.

Bosse, H.M., Böhm, R., Resch, S., Bachmann, S. 1995. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol.* **269**(6 Pt 2):F793-805. PMID:8594873.

Boustany, C.M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D.R., Randall, D.C., and Cassis, L.A. 2004. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **287**(4):R943-9. doi: 10.1152/ajpregu.00265.2004. PMID: 15191907.

Castro-Moreno, P., Pardo, J.P., Hernández-Muñoz, R., López-Guerrero, J.J., Del Valle-Mondragón, L., Pastelín-Hernández, G., et al. 2012. Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced

perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Auton Autacoid Pharmacol.* **32**(3 Pt 4):61-9.

doi: 10.1111/aap.12001. PMID: 22994939.

Castrop, H., Kammerl, M., Mann, B., Jensen, B.L., Krämer, B.K., and Kurtz, A. 2000.

Cyclooxygenase 2 and neuronal nitric oxide synthase expression in the renal cortex are not interdependent in states of salt deficiency. *Pflugers Arch.* **441**(2-3):235-40. PMID: 11211108.

Castrop, H., Schweda, F., Mizel, D., Huang, Y., Briggs, J., and Kurtz, A., et al. 2004.

Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* **286**: F848–57. PMID: 15075180.

Castrop, H., Schweda, F., Schumacher, K., Wolf, K., and Kurtz, A. 2001. Role of

renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol.* **12**(5):867-74. PMID: 11316844.

Caughey, G.E., Cleland, L.G., Penglis, P.S., Gamble, J.R., and James M.J. 2001. Roles of

Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective Up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2. *J. Immunol.* **167**:2831-38. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2831. PMID: 11509629.

Cheng, H.F., Wang, J.L., Zhang, M.Z., Miyazaki, Y., Ichikawa, I., McKanna, J.A., et al.

1999. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest.* **103**(7):953-61. doi:10.1172/JCI5505. PMID:10194467.

## Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**(1):156-9. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2. PMID: 2440339.

D'Abril Ruíz-Leyja, E., Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J.J., Gallardo-Ortíz, I.A., Estrada-Soto, S.E., and Ibarra-Barajas, M. 2013. Differential role of cyclooxygenase-1 and -2 on renal vasoconstriction to  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in normotensive and hypertensive rats. *Life Sci.* **11;93**(16):552-7. doi: 10.1016/j.lfs.2013.08.014. PMID: 24012611.

De Gennaro Colonna, V., Rossoni, G., Rigamonti, A., Bonomo, S., Manfredi, B., Berti, F., et al. 2002. Enalapril and quinapril improve endothelial vasodilator function and aortic eNOS gene expression in L-NAME-treated rats. *Eur J Pharmacol.* **16;450**(1):61-6. doi: 10.1016/S0014-2999(02)02046-0. PMID: 12176110.

Ferrario, CM. 2006. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension.* **47**(3):515-21. doi: 10.1161/01.HYP.0000196268.08909.fb. PMID: 16365192.

Friis, U.G., Stubbe, J., Uhrenholt, T.R., Svenningsen, P., Nüsing, R.M., Skøtt, O., et al. 2005. Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* **289**(5):F989-97. doi: 10.1152/ajprenal.00201.2005. PMID: 15985651.

## Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Fujino, T., Nakagawa, N., Yuhki, K., Hara, A., Yamada, T., Takayama, K., et al. 2004. Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I<sub>2</sub> receptor IP. *J Clin Invest.* **114**(6):805-12. doi: 10.1172/JCI200421382. PMID: 15372104.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **27**;288(5789):373-6. PMID: 6253831.

Gryglewski, R.-J., Chłopicki, S., and Swies, J. 2005. In vivo endothelial interaction between ACE and COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **72**(2):129-31. doi: 10.1016/j.plefa.2004.10.010 2005. PMID: 15626595.

Gryglewski, R.-J., Swies, J., Uracz, W., Chłopicki, S., and Marcinkiewicz, E. 2003. Mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor induced thrombolysis in Wistar rats. *Thromb Res.* **15**;110(5-6):323-9. doi: 10.1016/j.thromres.2003.08.005. PMID: 14592556.

Gryglewski, R.-J., Uracz, W., Swies, J., Chłopicki, S., Marcinkiewicz, E., and Lomnicka, M., Madej, J. 2001. Comparison of endothelial pleiotropic actions of angiotensin converting enzyme inhibitors and statins. *Ann NY Acad Sci.* **947**: 229–46. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03945.x. PMID: 11795271.

Harding, P., Sigmon, D.H., Alfie, M.E., Huang, P.L., Fishman, M.C., Beierwaltes, W.H., et al. 1997. Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension.* **29**(1 Pt 2):297-302. doi: 10.1161/01.HYP.29.1.297. PMID: 9039118.

## Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Harris, R.C., Cheng, H., Wang, J., Zhang, M., and McKanna, J.A. 2000. Interactions of the renin-angiotensin system and neuronal nitric oxide synthase in regulation of cyclooxygenase-2 in the macula densa. *Acta Physiol Scand.* **168**(1):47-51. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00642.x. PMID: 10691779.

Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., Dubois, R. N., and Breyer, M.D. 1994. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* **94**(6):2504–10. doi: 10.1172/JCI117620. PMCID: PMC330084.

Hartner, A., Goppelt-Struebe, M., and Hilgers, K.F. 1998. Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension.* **31**(1 Pt 2):201-5. doi: 10.1161/01.HYP.31.1.201. PMID: 9453303.

Ibarra, M., López-Guerrero, J.J., Mejía-Zepeda, R., and Villalobos-Molina, R. 2006. Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. *Arch Med Res.* **37**(3):334-41. doi:10.1016/j.arcmed.2005.06.015. PMID: 16513481.

Ibarra, M., Meneses, A., Ransanz, V., Castillo, C., and Hong, E. 1995. Changes in endothelium-dependent vascular responses associated with spontaneous hypertension and age in rats. *Arch Med Res.* **26**:S177-83. PMID: 8845647.

Ichii, O., Yabuki, A., Ojima, T., Matsumoto, M., Taniguchi, K., and Suzuki, S. 2008. Immunohistochemical localization of renin, NO synthase-1, and cyclooxygenase-2 in rodent kidney. *Histol Histopathol.* **23**(2):143-50. PMID: 17999370.

Inaba, S., Iwai, M., Furuno, M., Kanno, H., Senba, I., Okayama, H., Mogi, M., Higaki, J., Horiuchi, M., 2011. Role of angiotensin-converting enzyme 2 in cardiac hypertrophy induced by nitric oxide synthase inhibition. *J Hypertens.* **29**(11):2236-45. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834bbb4d. PMID: 21946695.

Imig, J.-D., Zhao, X., Orengo, S.-R., Dipp, S., and El-Dahr, S.-S. 2003. The Bradykinin B2 receptor is required for full expression of renal COX-2 and renin. *Peptides.* **24**:1141-47. doi: 10.1016/j.peptides.2003.07.003. PMID: 14612184.

Jensen, B.L., Schmid, C., and Kurtz, A. 1996. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol.* **271**(3 Pt 2):F659-69. PMID:8853429.

Joannides, R., Richard, V., Haefeli, W.E., Linder, L., Lüscher, T.F., and Thuillez, C.1995. Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension.* **26**(2):327-31. doi: 10.1161/01.HYP.26.2.327. PMID: 7635543.

Kammerl, M.C., Richthammer, W., Kurtz, A., and Kramer, B.K. 2002. Angiotensin II feedback is a regulator of renocortical renin, COX-2, and nNOS expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **282**(6): R1613-17. doi: 10.1152/ajpregu.00464.2001. PMID: 12010742.



Khan, K.N., Venturini, C.M., Bunch, R.T., Brassard, J.A., Koki, A.T., Morris, D.L., et al. 1998. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms:

**Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**

implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* **26**(5):612-20. doi:10.1177/019262339802600504. PMID: 9789947.

Kohno, M., Yokokawa, K., Minami, M., Yasunari, K., Maeda, K., Kano, H., et al. 1999. Plasma levels of nitric oxide and related vasoactive factors following long-term treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with essential hypertension. *Metabolism.* **48**(10):1256-59. HYPERLINK "[http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(99\)90264-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90264-0)" \t "doilink" .doi.org/10.1016/S0026-0495(99)90264-0. PMID: 10535387.

Kommareddy, M., McAllister, R.M., Ganjam, V.K., Turk, J.R., and Laughlin, M.H. 2011. Upregulation of cyclooxygenase-2 expression in porcine macula densa with chronic nitric oxide synthase inhibition. *Vet Pathol.* **48**(6):1125-33. doi: 10.1177/0300985810391109. PMID: 21160023.

Linz, W., Wiemer, G., Schaper, J., Zimmermann, R., Nagasawa, K., Gohlke, P., et al. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Mol Cell Biochem.* **147**(1-2):89-97. PMID: 7494560.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. *Methods*. **25**(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

### **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**

Mann, B., Hartner, A., Jensen, B.L., Hilgers, K.F., Höcherl, K., Krämer, B.K., et al. 2001. Acute upregulation of COX-2 by renal artery stenosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. **280**(1):F119-25. PMID: 11133522.

Mundel, P., Bachmann, S., Bader, M., Fischer, A., Kummer, W., Mayer, B., et al. 1992. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int*. **42**(1):1017-19. doi:10.1038/ki.1992.382. PMID: 1280698.

Muthalif, M.M., Benter, I.F., Uddin, M.R., Harper, J.L., Malik, K.U. 1998. Signal Transduction Mechanisms Involved in Angiotensin-(1-7) Stimulated Arachidonic Acid Release and Prostanoid Synthesis in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. **284**(1):388-98. PMID: 9435202.

Nguyen Dinh Cat A and Touyz, R.M. 2011. A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the vascular system. *Peptides*. **32**(10):2141-50. doi: 10.1016/j.peptides.2011.09.010. PMID: 21945916.

Park, S.B., Jee, B.C., Kim, S.H., Cho, Y.J., Han, M. 2014. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits leiomyoma cell proliferation through the Nuclear Factor kB Pathway. *Reprod Sci.* **21**(9):1187-95. doi: 10.1177/1933719114542010. PMID: 25001017.

### **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**

Qi, Z., Hao, C.M., Langenbach, R.I., Breyer, R.M., Redha, R., Morrow, J.D., et al. 2002. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest.* **110**(1):61-9. doi: 10.1172/JCI14752. PMID: 12093889.

Qiu, C., and Baylis, C. 1999. Endothelin and angiotensin mediate most glomerular responses to nitric oxide inhibition. *Kidney Int.* **55**(6):2390-6. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00466.x. PMID: 10757276.

Qiu, C., Engels, K., and Baylis, C. 1994. Angiotensin II and alpha 1-adrenergic tone in chronic nitric oxide blockade-induced hypertension. *Am J Physiol.* **266**(5 Pt 2):R1470-6. PMID: 8203622

Qiu, C., Engels, K., and Baylis, C. 1995. Endothelin modulates the pressor actions of acute systemic nitric oxide blockade. *J Am Soc Nephrol.* **6**(5):1476-81. PMID: 8589326.

Qiu, C., Muchant, D., Beierwaltes, W.H., Racusen, L., and Baylis, C. 1998. Evolution of chronic nitric oxide inhibition hypertension: relationship to renal function. *Hypertension*. **31**(1):21-6. doi: 10.1161/01.HYP.31.1.21. PMID: 9449385.

Ribeiro, M.O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisollo, S.M., and Zatz, R. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. **20**(3):298-303. doi: 10.1161/01.HYP.20.3.298. PMID: 1516948.

### **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**

Richard, V., Hogie, M., Clozel, M., Löffler, B.M., and Thuillez, C. 1995. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation*. **1**;91(3):771-5. doi: 10.1161/01.CIR.91.3.771. PMID: 7828305.

Santos, R.A., and Ferreira, A.J. 2007. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **16**(2):122-8. PMID: 17293687.

Schricker, K., Hamann, M., and Kurtz, A. 1995. Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am J Physiol*. **269**(6 Pt 2):F825-30. PMID: 8594876.

Schricker, K., Pötlz, B., Hamann, M., and Kurtz, A. 1996. Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. *Pflugers Arch*. **432**(3):394-400. doi:10.1007/s004249900214. PMID: 8765998.

Tenorio-López, F.A., Zarco-Olvera, G., Sánchez-Mendoza, A., Rosas-Peralta, M., Pastelín-Hernández, G., and del Valle-Mondragón, L. 2010. Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta*. **15**;80(5):1702-12. doi: 10.1016/j.talanta.2009.10.010. PMID: 20152400.

Tojo, A., Madsen, K.M., Wilcox, C.S. 1995. Expression of immunoreactive nitric oxide synthase isoforms in rat kidney. Effects of dietary salt and losartan. *Jpn Heart J*. **36**(3):389-98. PMID: 7544416.

### **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**

Tomida, T., Numaguchi, Y., Nishimoto, Y., Tsuzuki, M., Hayashi, Y., Imai, H., et al. 2003. Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  formation in L-NAME-treated rats. *J Hypertens*. **21**(3):601-9. PMID: 12640255.

Velez, J.C., Ryan, K.J., Harbeson, C.E., Bland, A.M., Budisavljevic, M.N., Arthur, J.M., et al. 2009. Angiotensin I is largely converted to angiotensin (1-7) and angiotensin (2-10) by isolated rat glomeruli. *Hypertension*. **53**(5):790-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.128819. PMID: 1928951.

Wang, J.L., Cheng, H.F., and Harris, R.C. 1999. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension*. **34**(1):96-101. doi: 10.1161/01.HYP.34.1.9. PMID: 10406830.

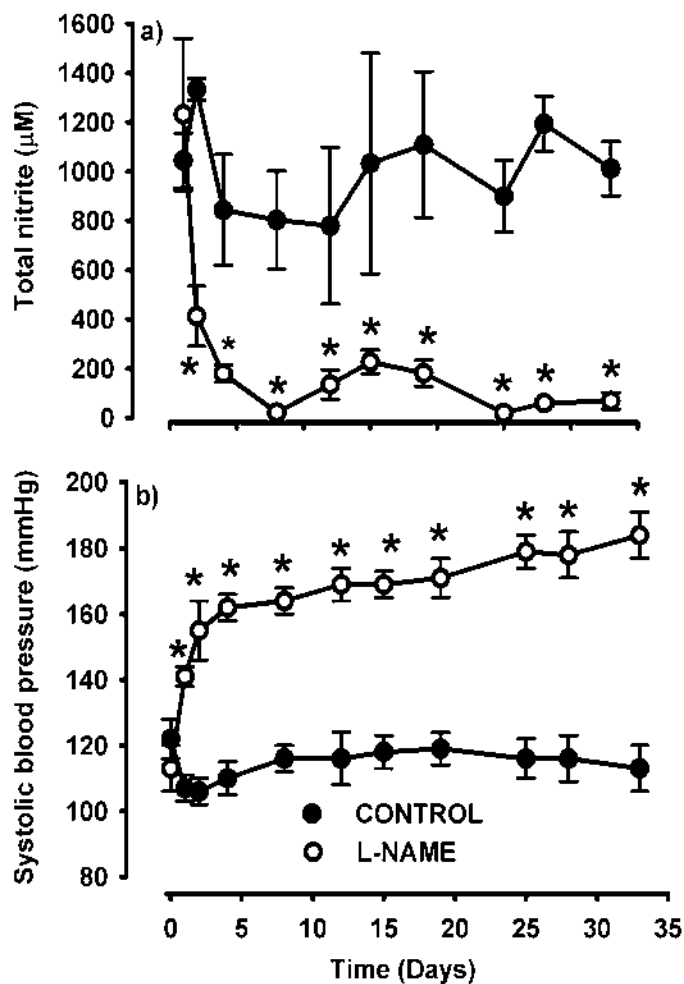
Zhang, M.Z., Yao, B., Cheng, H.-F., Wang, S.-W., Inagami, T., and Harris, R.C. 2006. Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II AT (1) and AT (2) receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 24; **103**(43): 16045-50. doi: 10.1073/pnas.0602176103. PMID: 17043228.

Zhao, X., Ho, D., Gao, S., Hong, C., Vatner, D.E., Vatner, S.F. 2011. Arterial Pressure Monitoring in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* **1**:105-22. doi:10.1002/9780470942390.mo100149. PMID: 21686061.

Table 1. Kidney weight/Body weight ratio and creatinine clearance

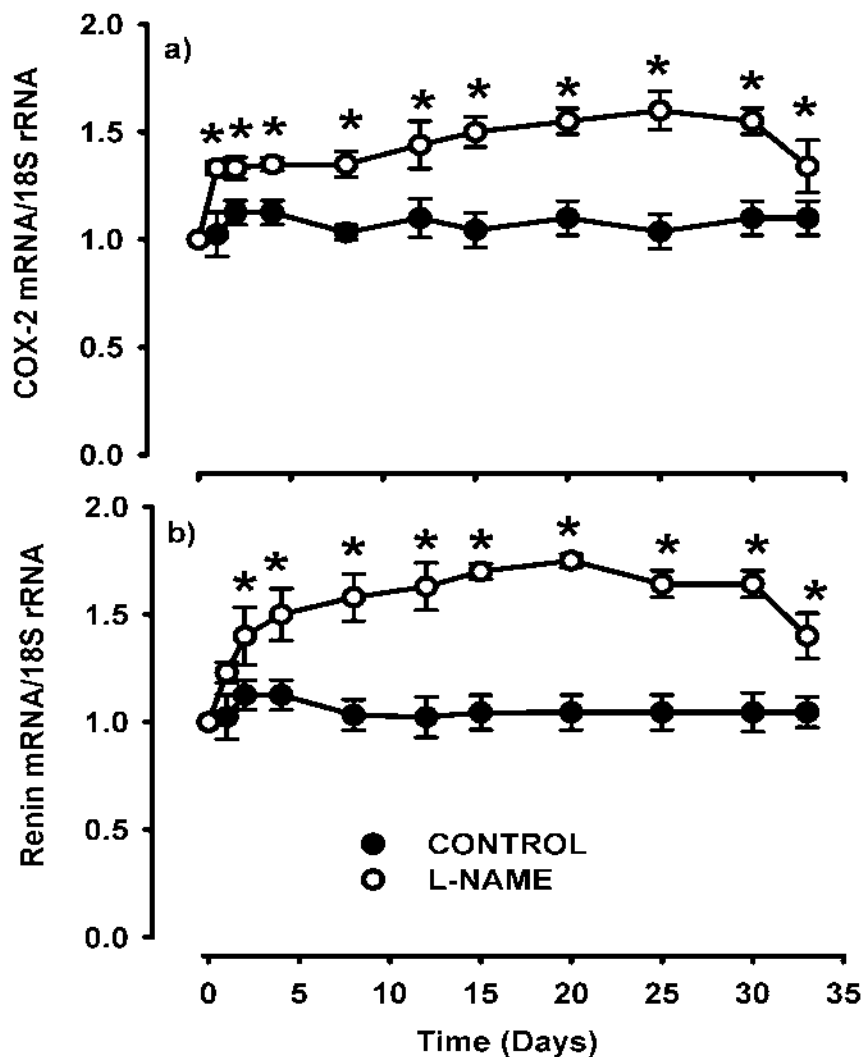
Parameters	Duration of treatment	L-NAME				
		Control	L-NAME	+ CAP	+ CEL	+ CAP/CEL
KW/BW (mg/g)	Day 2	4.24 ± 0.07	4.18 ± 0.08	4.2 ± 0.08	4.23 ± 0.08	4.13 ± 0.08
	Day 19	4.38 ± 0.27	4.03 ± 0.18	4.24 ± 0.19	4.2 ± 0.13	4.27 ± 0.02
Ccr (ml/min)	Day 2	1.95 ± 0.22	2.1 ± 0.25	2.39 ± 0.19	2.08 ± 0.15	2.38 ± 0.09
	Day 19	2.33 ± 0.019	0.89 ± 0.10*	2.37 ± 0.16&	0.95 ± 0.125*	1.64 ± 0.46*&

Results are presented as mean ± S.E.M. (n=6). Abbreviations: KW (Kidney weight); BW (Body weight); Ccr (creatinine clearance); CAP (captopril); CEL (celecoxib). \*P < 0.05 vs Control, & P < 0.05 vs L-NAME.

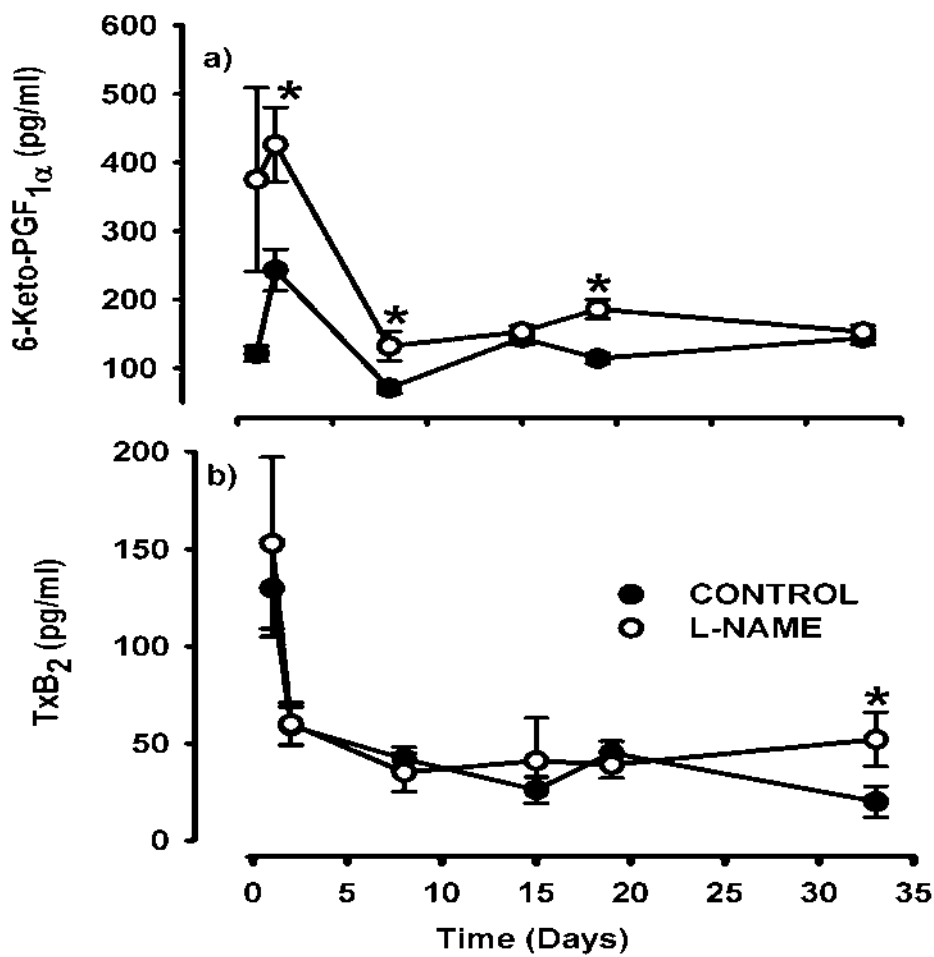


**Figure 1.** a) Time-course of urinary excretion of the NO metabolites nitrate and nitrite after L-NAME ingestion (75 mg/kg/day). b) Time-course of systolic blood pressure after L-NAME ingestion (75 mg/kg/day). Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 rats per group.\*  $p < 0.05$  compared with control group.

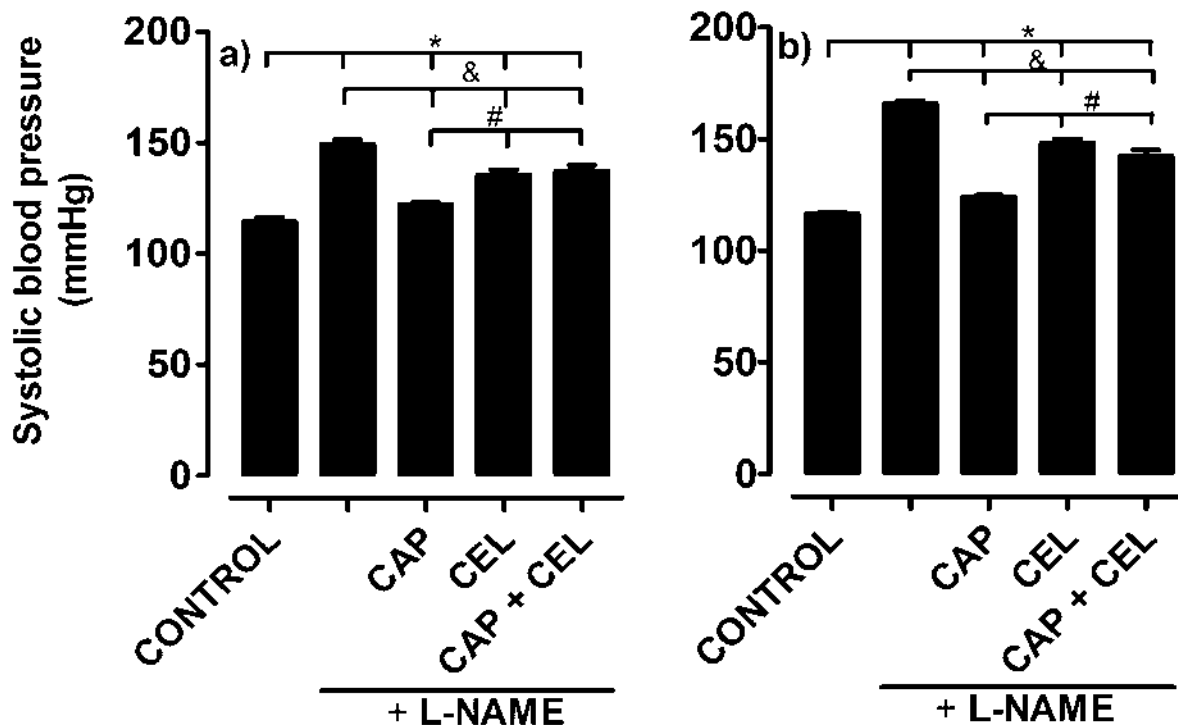




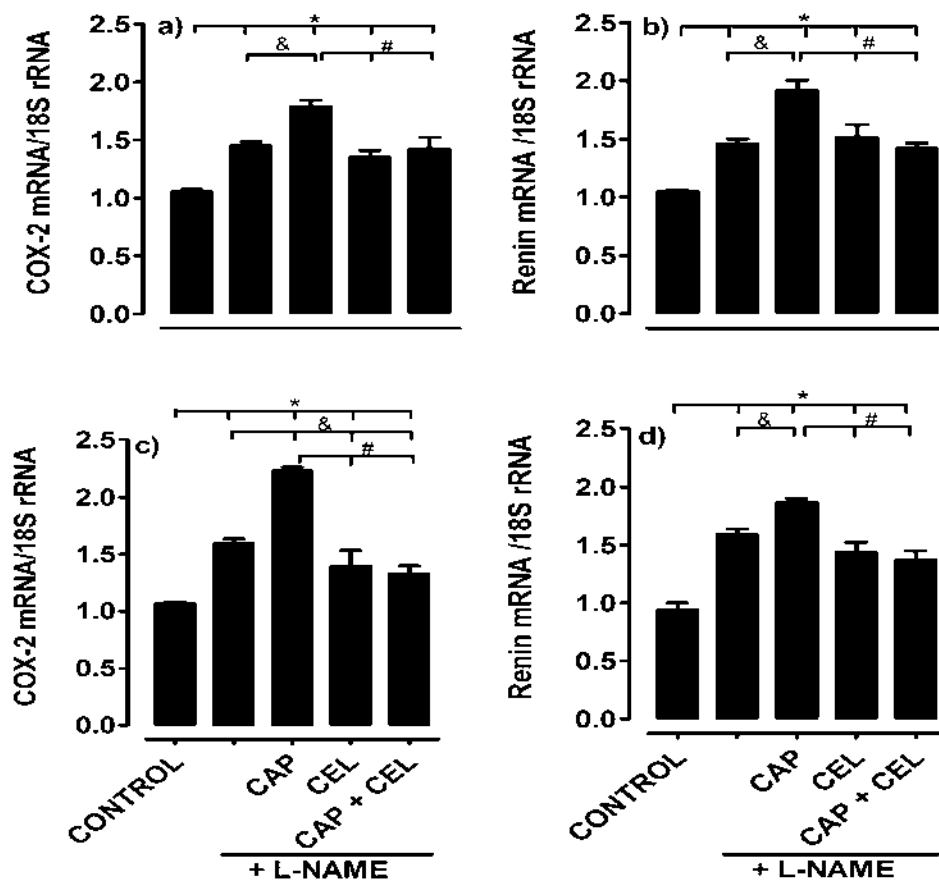
**Figure 2.** Time-course of the renal cortical expression of COX-2 and renin genes in control and L-NAME-treated hypertensive rats. a) Time-course of renal cortical COX-2 mRNA expression. b) Time-course of renal cortical renin mRNA expression. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 5 rats per group. Values are expressed as the ratio of COX-2/18S rRNA or renin/18S rRNA. \*  $p < 0.05$  compared with control group.



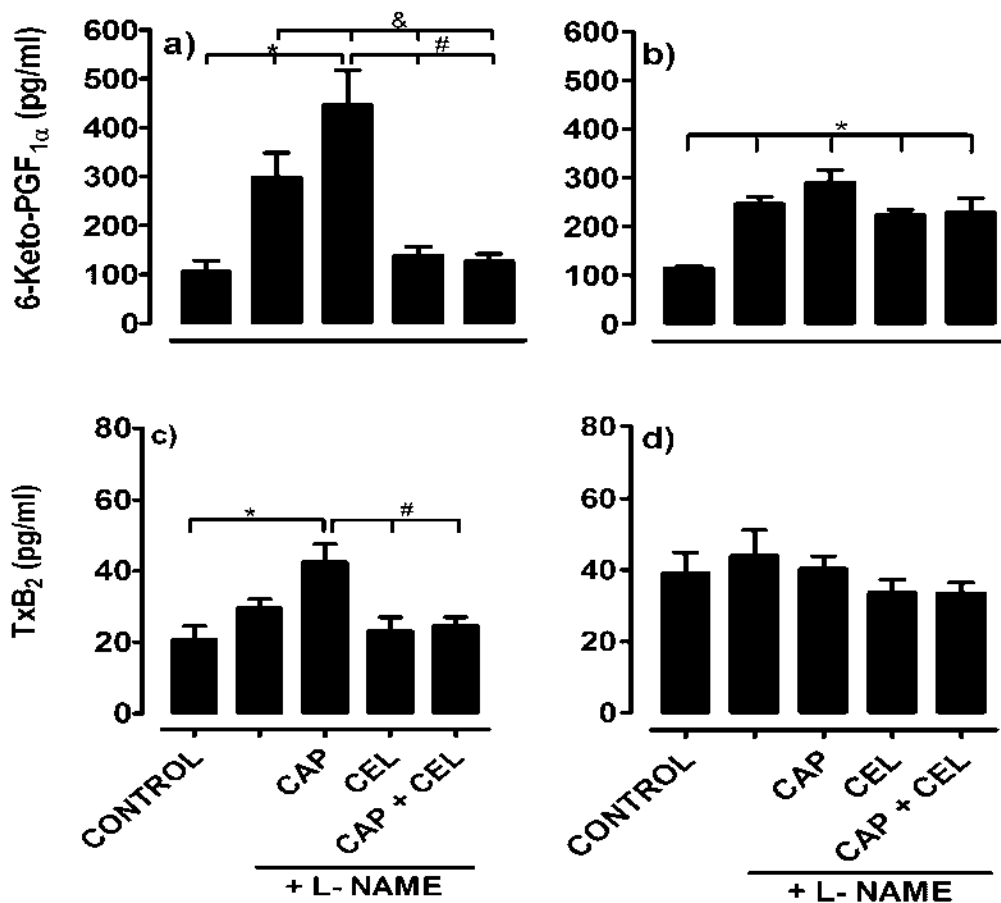
**Figure 3.** Release of 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> and TxB<sub>2</sub> from the isolated perfused kidneys of L-NAME-treated rats. a) Time-course of 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> release from isolated perfused kidneys after L-NAME ingestion (75 mg/kg/day). b) Time-course of TxB<sub>2</sub> release from isolated perfused kidneys after L-NAME ingestion (75 mg/kg/day). Each point represents the mean ± SEM of 5 rats per group. \* p < 0.05 compared with control group.



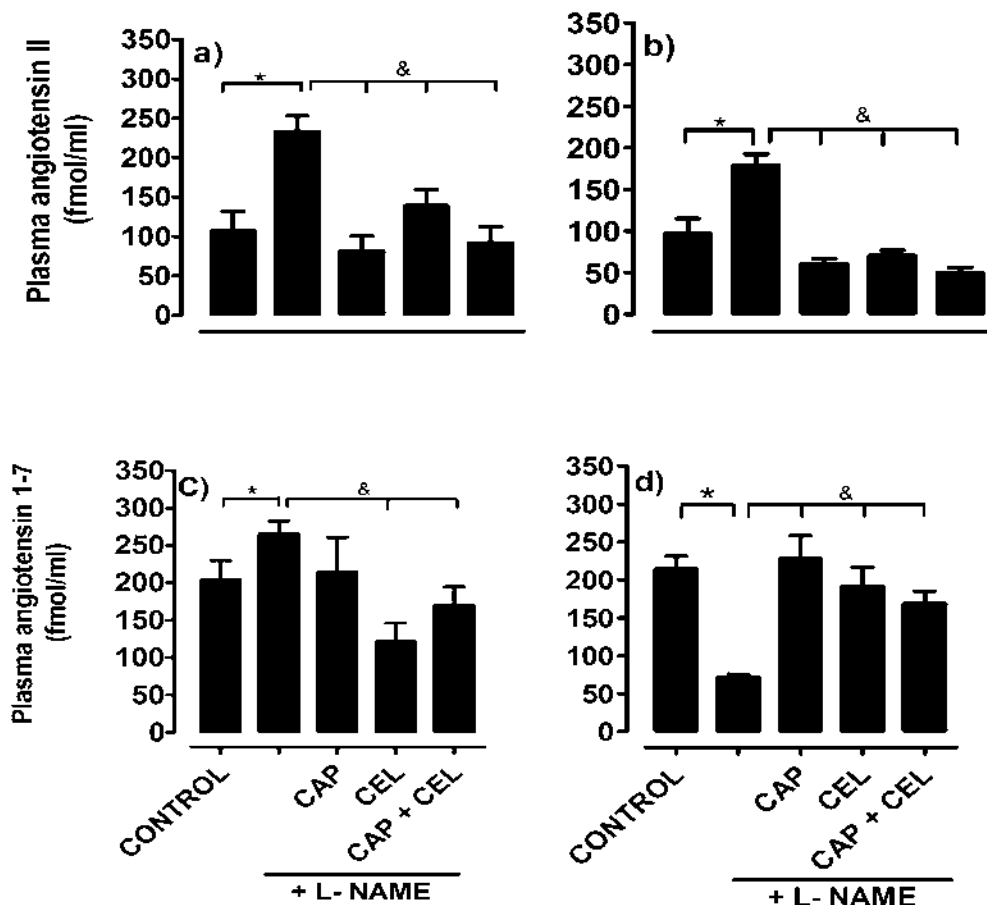
**Figure 4.** Effect of treatment with captopril (CAP), celecoxib (CEL) and their combination (CAP + CEL) for 2 or 19 days on the systolic blood pressure of L-NAME-treated rats. a) Systolic blood pressure after 2 days of treatment. b) Systolic blood pressure after 19 days of treatment. Values represent the means  $\pm$  SEM of 6 rats per group. \*  $p < 0.05$  compared with control group; &  $p < 0.05$  compared with L-NAME group; #  $p < 0.05$  compared with L-NAME + Captopril group.



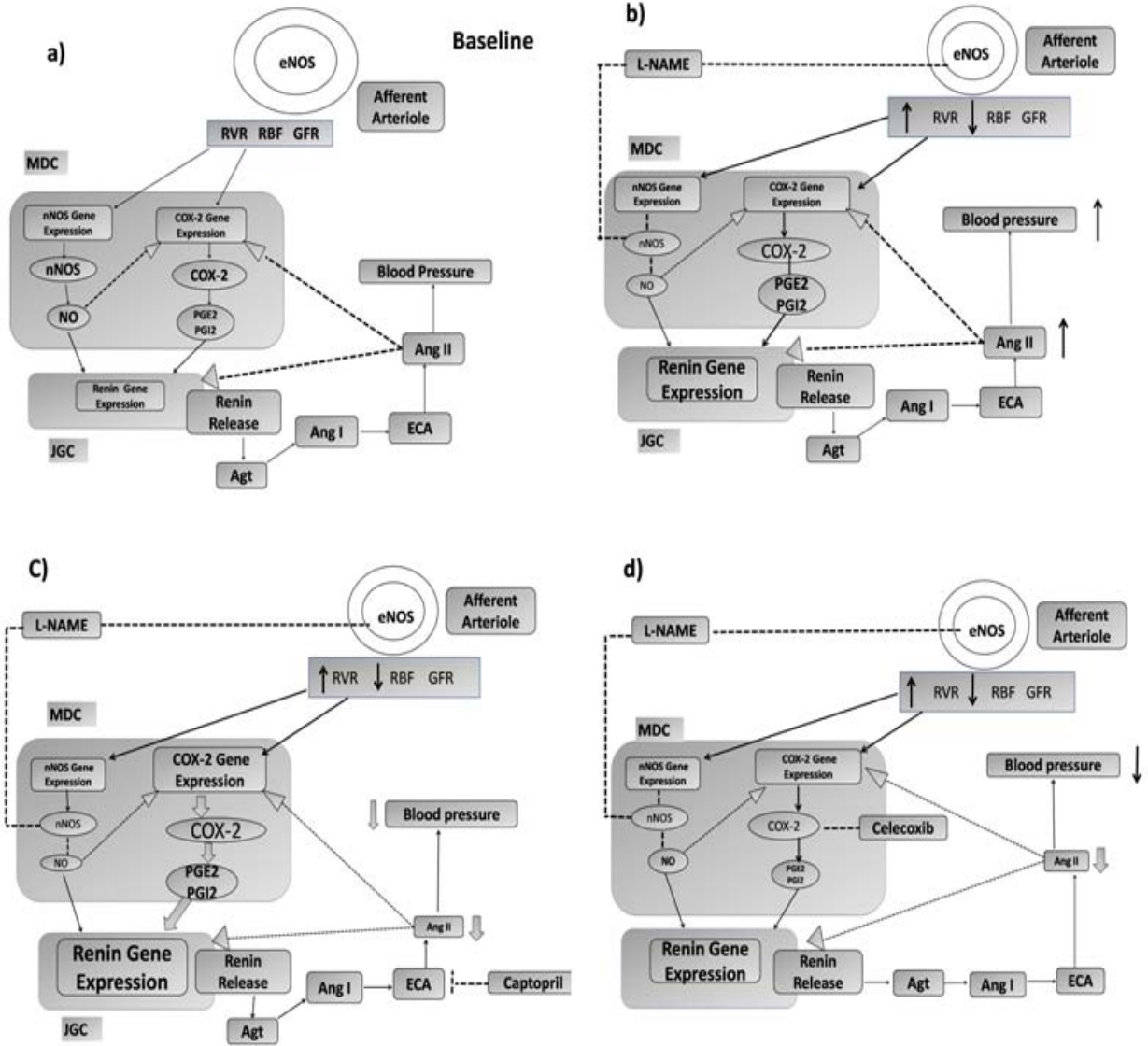
**Figure 5.** Effect of treatment with captopril (CAP), celecoxib (CEL) and their combination (CAP + CEL) for 2 or 19 days on COX-2 and renin mRNA expression in L-NAME-treated hypertensive rats. a) COX-2 and b) renin mRNA expression after 2 days of treatment. c) COX-2 and d) renin mRNA expression after 19 days of treatment. Values are the ratios of COX-2/18S rRNA or renin/18S rRNA. The values represent the means  $\pm$  SEM of 6 rats per group. \*  $p < 0.05$  compared with control group; &  $p < 0.05$  compared with L-NAME group; #  $p < 0.05$  compared with L-NAME + captopril group.



**Figure 6.** Effect of treatment with captopril (CAP), celecoxib (CEL) and their combination (CAP + CEL) for 2 or 19 days on release of prostanoids by isolated kidneys from hypertensive rats. 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> (a, b) and TxB<sub>2</sub> (c, d) from the isolated perfused kidney of rats treated for 2 (a, c) or 19 days (b, d) with L-NAME, L-NAME + captopril, their combination, or vehicle (control). Values represent the means ± SEM of 16 rats per group. \* p < 0.05 compared with control group; & p < 0.05 compared with L-NAME group; # p < 0.05 compared with L-NAME + captopril group.



**Figure 7.** Effect of treatment with captopril (CAP), celecoxib (CEL) and their combination (CAP + CEL) for 2 or 19 days on the level of plasma angiotensin II and angiotensin 1-7 in L-NAME-treated hypertensive rats. a) Plasma angiotensin II at day 2. b) Plasma angiotensin II at day 19. c) Plasma angiotensin 1-7 at day 2. d) plasma angiotensin 1-7 at day 19. Values represent the means  $\pm$  SEM of 6 rats per group. \*  $p < 0.05$  compared with control group; &  $p < 0.05$  compared with L-NAME group.



**Figure 8.** Schematic illustration of cyclooxygenase-2 (COX-2), nitric oxide synthase and renin interactions: a) baseline; note that NO has negative modulatory influence on COX-2 gene in MDC and positive modulatory influence on renin gene in JGC; COX-2 has positive modulatory influence on renin gene and Ang II exerts negative feedback action on COX-2

and renin gene. Under basal conditions there is a homeostatic balance between vasodilator and vasoconstrictor substances, regulating vascular tone and COX-2 and renin expression.

b) chronic nitric oxide synthesis inhibition with L-NAME increases RVR with consequent fall in RBF which is detected by the MDC, augmenting the expression of COX-2, COX-2-derived vasodilator prostaglandins (PGE<sub>2</sub> or PGI<sub>2</sub>) synthesis and renin. In addition, L-NAME decreases negative modulatory influence of NO on COX-2 gene.

c) captopril reduces negative feedback action of Ang II on COX-2 and renin expression as well as RVR by increase COX-2-derived vasodilator prostaglandins.

d) celecoxib reduces COX-2-derived vasodilator prostaglandins and plasma angiotensin II levels; so it has a partial effect on RVR.

Abbreviations: MDC, macula densa cell; JGC, juxtaglomerular cell, RBF, renal blood flow; GFR, glomerular filtration rate; RVR, renal vascular resistance; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, Agt, angiotensinogen; Ang I, angiotensin I; ACE, angiotensin converting enzyme; Ang II, angiotensin II.