



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Efecto de la capsaicina y la capsacepina en el
corazón de ratas hipertensas. Relación con el
sistema renina angiotensina.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGICO**

**PRESENTA:
ANDREA XIMENA GIRÓN CEBALLOS**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. VICENTE CASTREJÓN TÉLLEZ**

**ASESOR DE TESIS
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE**

CIUDAD DE MÉXICO

2019





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MIRNA RUIZ RAMOS

VOCAL: DR. VICENTE CASTREJÓN TÉLLEZ

SECRETARIO: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

1er. SUPLENTE: M. EN C. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA

2° SUPLENTE: Q.F.B. JACQUELINE GONZÁLEZ CERVANTES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

Agradecimientos.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa, por hacerme una profesional con ética y valores, por brindarme un lugar entre sus alumnos y permitirme ser capaz de tener una carrera universitaria.
- A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por hacerme sentir orgullosa de pertenecer a la comunidad zaragozana, como estudiante y como egresada; por brindarme la oportunidad de formarme en sus instalaciones.
- Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por aceptarme como una de sus estudiantes.
- Al Doctor Vicente Castrejón Téllez, por aceptarme en el laboratorio, por su apoyo y su amistad. Doc. ¡Es usted una gran persona!
- A la Doctora María Esther Rubio Ruiz, por su amistad, por su apoyo incondicional, sus asesorías y por creer siempre en mí.
- A la Dra. Mirna Ruiz Ramos por su dedicación al presente trabajo, sus observaciones y sus comentarios.
- A la Dra. Raquel Retana Ugalde, por su apoyo durante el proceso.
- A la Q.F.B. Jacqueline González Cervantes por sus observaciones en el presente trabajo.
- A la M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara por su dedicación a en la revisión del presente trabajo.

Dedicatoria.

- A mi hija Nataly, por ser una angelita llena de vida y alegría... ¡Te amo mi hermosa niña!
- A Alejandra, mi esposa, por ser mi ejemplo de lucha y perseverancia, por darme la oportunidad de estar en su vida, por todas las risas y aventuras juntas... Sabes que te amo infinitamente, este logro es de las dos, ¡gracias por tu apoyo incondicional!
- A mis padres, Blanca Lidia Ceballos y José Antonio Girón Gómez, por educarme con valores y darme estudio desde pequeña. Papitos, esto es posible gracias a ustedes. ¡Los amo con toda el alma!
- A mis amigos de la universidad: Melvin, Raúl, Leslie, Julio Iván, Miguel, Erick, Ariadne, Gabriel, Carolina, Iván (el tito), Samantha, Silvia, Sandra, Elizabeth. La universidad fue más divertida con ustedes, ¡los quiero!
- A mí, por crecer, por creer en mí, por ser quien soy ahora, por no rendirme, por esforzarme siempre por salir adelante, por permitirme vivir la experiencia llamada universidad, ¡te quiero xime!

Índice

I.	Abreviaturas	8
II.	Introducción	12
III.	Marco teórico	15
III.1.	Hipertensión arterial (HTA)	15
III.1.1.	Prevalencia de la HTA en México	17
III.1.2.	Factores de riesgo que predisponen a padecer HTA	18
III.1.3.	Tratamiento: Farmacológico y no farmacológico	20
III.2.	Los receptores de potencial transitorio (TRPs)	21
III.2.1.	La Subfamilia Vaniloide (TRPV)	23
III.2.2.	Características estructurales y bioquímicas del receptor Vaniloide tipo 1 (TRPV1)	25
III.2.3.	Activadores y regulación del TRPV1	27
III.2.4.	Relación entre el receptor TRPV1 y la Hipertensión Arterial	28
III.2.5.	La capsaicina como activador exógeno del receptor TRPV1	30
III.2.6.	La anandamida como el activador endógeno del receptor TRPV1	33
III.2.7.	La capsacepina, un antagonista del receptor TRPV1	34
III.3.	El Sistema Renina Angiotensina (RAS)	35
III.3.1.	Regulación de la HTA con el Sistema Renina Angiotensina	37
III.3.2.	Los receptores de Angiotensina II, AT1 y AT2	38
III.4.	El Papel del Proliferador Peroxisomal tipo gamma (PPAR γ) en la HTA	42

III.5. Papel de la GTPasa pequeña Rho en la HTA	45
III.6. El estrés oxidativo en la HTA	49
IV. Planteamiento del problema	53
V. Hipótesis	55
VI. Objetivos	56
VI.1. Objetivo General	56
VI.2. Objetivos Particulares	56
VII. Material y métodos	58
VII.1 Material biológico	58
VII.2 Material químico	58
VII.3 Grupos Experimentales	59
VII.4 Determinación de la presión arterial	60
VII.5 Extracción de Ventrículo Izquierdo	61
VII.6 Extracción de proteína	61
VII.7 Cuantificación de proteína	61
VII.8 Determinación de Óxido Nítrico	62
VII.9 Separación de proteínas por electroforesis	62
VII.10 Trasferencia de proteínas	63
VII.11 Bloqueo de la membrana de PVDF	63
VII.12 Determinación de proteínas por Western Blot	63
VII.13 Determinación de anticuerpos por inmunoquimioluminiscencia	64
VII.14 Análisis estadístico.	65
VIII. Resultados.	66
VIII.1 Determinación de la presión arterial de ratas normo e hipertensas.	66

VIII.2	Determinación de Óxido Nítrico en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	67
VIII.3	Expresión de la enzima Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	68
VIII.4	Expresión del receptor TRPV1 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	69
VIII.5	Expresión del receptor AT1 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	70
VIII.6	Expresión del receptor AT2 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	71
VIII.7	Expresión de PPAR γ en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	72
VIII.8	Expresión de Rho en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.	73
IX.	Discusión	74
IX.1.	Efecto de la capsaicina sobre la presión arterial y la síntesis de óxido nítrico en ratas normo e hipertensas.	74
IX.2.	Determinación de la enzima oxido nítrico sintasa endotelial y expresión del receptor TRPV1.	75
IX.3	Expresión de los receptores de angiotensina AT1 y AT2 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina y la relación con las proteínas Rho y PARR γ .	77
X.	Conclusiones	80
XI.	Perspectivas	81
XII.	Bibliografía.	82

I. Abreviaturas

HTA	Hipertensión Arterial
ENSANUT MC	Encuesta Nacional de Salud de Medio Camino.
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloide tipo 1.
AT1	Receptor de Angiotensina Tipo 1
AT2	Receptor de Angiotensina Tipo 2
L- NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
mmHg	milímetros de Mercurio.
OMS	Organización Mundial de la Salud
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystic
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrina
TRPV5	Transient Receptor Potential Vanilloide tipo 5

TRPV6	Transient Receptor Potential Vanilloide tipo 6
PIP2	fosfatidilinositol bisfosfato
HMG-CR	enzima HMG-CoA Reductasa
LDL-C	colesterol de baja densidad
PF-F/FPP	piro-fosfato de farnesilo
PF-GG/GGPP	piro-fosfato de geranil-geranilo
GTP	guanidin trifosfato
GDP	guanidin difosfato
PPARs	receptores activados por proliferadores peroxisomales
UCPs	proteínas desacoplantes
ERO/ROS	especies reactivas del oxígeno
NO	óxido nítrico
eNOS	enzima óxido nítrico sintasa.
ox-LDL	lipoproteína de baja densidad oxidada
DMSO	dimetilsulfoxido
VR1	Receptor Vanilloide tipo 1
TRPV2	Transient Receptor Potential Vanilloide tipo 2
TRPV3	Transient Receptor Potential Vanilloide tipo 3
TRPV4	Transient Receptor Potential Vanilloide tipo 4
KDa	KiloDaltons

PKA	Proteín Cinasa A
PKC	Protein Cinasa C
ATP	Adenosín Trifosfato
NAPE	araquidonilfosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	Fosfolipasa D específica de NAPE
NAEs	N-aciletanolamidas
AEA	N-araquidonoiletanolamina o anandamida
Receptor CB	Receptor Canabinoide
DAG	diacilglicerol
AG	Acilglicerol
FAAH	amido hidrolasa de ácidos grasos
FABP	Proteínas de unión de ácidos grasos.
MAGL	monoacilglicerol lipasa
AA	ácido araquidónico
AC	adenilil ciclasa
CAMKII	quinasa dependiente de calmodulina
RNA	Ácido ribonucleico
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
nM	nanoMolar
RTX	Resiniferatoxina

CB1	Receptor Canabinoide tipo 1
CB2	Receptor Canabinoide tipo 2
K _i	constante de inhibición
μM	micro Molar
AMT	transportador de anandamida
IP3	inositol-1,4,5-trifosfato
PI- PLC	Fosfatidilinositol unido a fosfolipasa C
HETE	ácido hidroxieicosatetraenoico
LOX	lipooxigenasa
PLD	Fosfolipasa D
RAAS	Sistema Renina Angiotensina – Aldosterona.
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
ECA2	Enzima Convertidora de Angiotensina 2

II. INTRODUCCIÓN.

A partir de que Stephen Hales determinó la presión arterial en animales, el interés por medir este parámetro en humanos se intensificó¹. En 1883, Samuel Von Basch, inventó un sistema no invasivo para determinar la presión arterial (el esfigmomanómetro), modificado después por Riva Rocci en 1896.²

A partir de aquí, inició toda una serie de estudios tratando de determinar la función de la presión arterial en la salud pública. De acuerdo a estos estudios se determinó que la presión arterial es estable cuando los niveles se encuentran alrededor de 80/110, dependiendo del género, y, se habla de hipertensión cuando los niveles son mayores a 90/140 mmHg. La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades renales, cardiovasculares y cerebrovasculares en nuestro país. En México, el Instituto Nacional de Salud realiza frecuentemente la Encuesta Nacional de Salud de Medio Camino (ENSANUT MC), donde se ha observado que la prevalencia de este padecimiento se ha mantenido prácticamente sin cambios entre 2012 y 2016 lo cual sugiere que deben intensificarse los esfuerzos del sistema de salud para mejorar la prevención y los medios de control de quien ya padece esta enfermedad.³

Poco a poco se ha estado profundizando en la patología de la hipertensión y en los mecanismos que contribuyen a su prevalencia. Tratando de aportar un poco más sobre ese mecanismo, en este trabajo se trató de analizar el papel y los mecanismos que involucran al receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1), con la presión arterial, utilizando capsaicina, como agonista natural y capsacepina como

antagonista del receptor, estudiando el efecto que ambos fármacos ejercen sobre la expresión del TRPV1, *per se*, y sobre algunas de las proteínas involucradas en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (uno de los principales reguladores de la presión arterial en el organismo), y de proteínas relacionadas con la regulación de este mecanismo; como son los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1), el receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2), la Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), el Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales Tipo gamma (PPAR γ) y la GTPasa pequeña Rho. Con la finalidad de entender si los receptores TRPV1 están relacionados con la regulación de la hipertensión, a través de mecanismos como el sistema renina-angiotensina y los reguladores de este sistema como el óxido nítrico vía la expresión de la enzima eNOS o de proteínas que controlan la síntesis de los receptores AT1 y AT2. En el diseño experimental se utilizaron ratas Wistar adultas, divididas en dos grupos, Control e Hipertensas, para formar el Grupo Hipertensas las ratas fueron tratadas con L-NAME (L- N^G nitroarginina metil ester) 200 mg/kg durante 40 días, para inducir hipertensión, finalmente fueron divididas en 8 grupos, tres ratas por grupo, ordenados de la siguiente manera: 1. Control, 2. Control + Capsaicina, 3. Control + Capsacepina, 4. Control + Capsaicina + Capsacepina 5. Hipertensas, 6. Hipertensas + Capsaicina, 7. Hipertensas + Capsacepina, 8. Hipertensas + Capsaicina + Capsacepina. Posterior a los tratamientos, se sacrificó a cada rata y se les extrajo el corazón, se seleccionó el ventrículo izquierdo, se homogenizó en buffer de lisis y se cuantificó la proteína por el método de Bradford, se separaron las proteínas con el método de SDS-PAGE y se realizó la inmunodetección por Western Blot. Los resultados fueron expresados como la

media \pm su error estándar. Y la comparación entre grupos de los diferentes tratamientos se realizó por análisis de varianza una sola vía (ANOVA), utilizando el programa Sigma Plot 11 (Jandel Scientific). Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

III. Marco Teórico.

III.1. Hipertensión Arterial (HTA).

Cuando el corazón trabaja e impulsa la sangre a través de la red de arterias, venas y capilares en el organismo, la sangre en movimiento empuja contra las paredes de las arterias ejerciendo fuerza, esta fuerza es la que se mide como presión arterial, lo cual significa que la presión arterial, es la fuerza necesaria para que la sangre pueda circular a través de las arterias.⁴

La hipertensión arterial (HTA) es el término médico que describe la presión arterial alta, conocida como «la muerte silenciosa». Sin tratamiento, la HTA aumenta el riesgo de un ataque al corazón o un accidente cerebrovascular.

De hecho, la presión sanguínea (Figura 1), es un signo vital utilizado en la toma de decisiones clínicas, debido su gran importancia en la salud, es esencial determinar la presión sanguínea adecuada y constantemente. En este proceso son dos los valores que se determinan: la presión sistólica, que representa la presión arterial pico durante la sístole (proceso que consiste en la contracción del tejido muscular auricular y ventricular cardíaco) y la presión diastólica, que representa la presión arterial mínima durante la diástole (momento en que el corazón se relaja completamente y permite que el flujo sanguíneo, proveniente de los pulmones y las arterias, vuelva a ingresar a las cavidades ventriculares y auriculares para que, se repita el ciclo cardíaco). En la actualidad, los expertos definen a la HTA como aquellos valores de presión arterial que van por arriba de 140/90 mmHg, de estas dos cifras, una o ambas pueden ser altas en las personas hipertensas.

Cuando los valores de presión arterial están por arriba de 120/80 mmHg, pero no alcanzan los valores de 140/90, entonces nos encontramos con un cuadro conocido como pre-hipertensión, momento en el cual, el paciente deberá empezar a cuidarse más.

La presión arterial alta es generada principalmente por el estrechamiento de las arteriolas, quienes regulan el flujo sanguíneo en todo el organismo. A medida que estas arteriolas se hacen más estrechas, el corazón se esfuerza más para poder bombear la sangre a través de esos espacios más reducidos provocando que la presión dentro de los vasos sanguíneos aumente.⁵

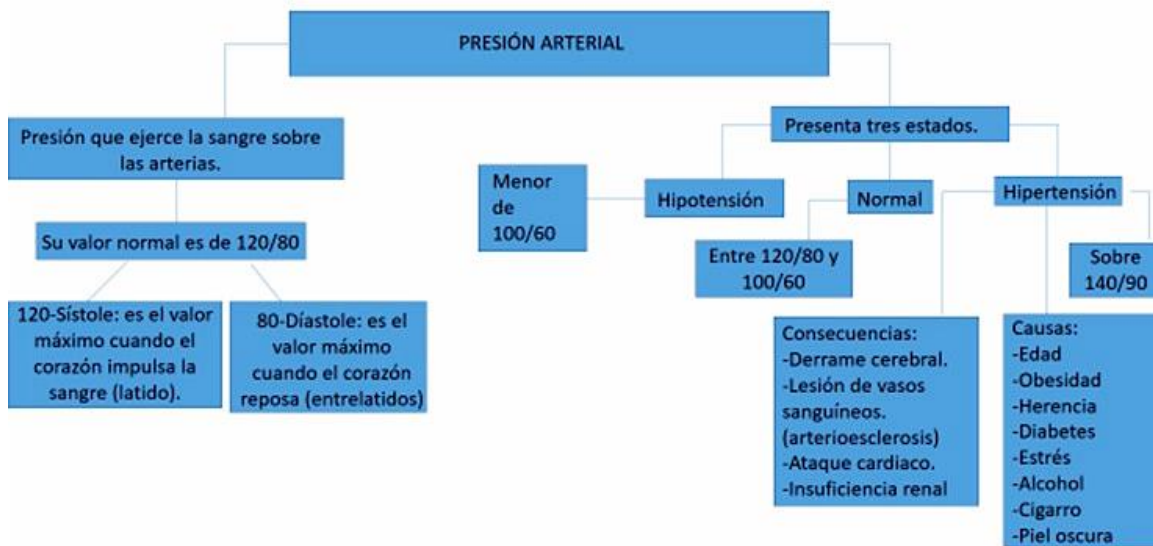


Figura 1. Principales características de la presión arterial y las consecuencias sobre su alteración en el organismo. En la toma de la presión arterial, se deben tomar en cuenta dos valores, la sístole y la diástole, puede ocurrir que uno o ambos valores se encuentren fuera de rango; las alteraciones son variadas así como las causas que provocan esta enfermedad en el ser humano.⁵

La HTA es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular en el humano, en la mayoría de casos no presenta síntomas, por lo que se pueden llegar a desarrollar problemas cardíacos, cerebrales o renales sin ser conscientes de padecer la enfermedad. La OMS estima que unos 1,000 millones de personas la

padecen en todo el mundo y que al año mueren 9 millones de personas por esta causa.

La HTA es una enfermedad que depende de la interacción entre el gasto cardiaco, la resistencia periférica y el volumen intravascular, se clasifica en dos tipos: primaria y secundaria, la primaria se presenta sin causa aparente en el 95% de los casos y es multifactorial; la secundaria, es provocada normalmente por otra enfermedad, en algunos casos es reversible cuando la enfermedad adyacente es tratada con éxito, sólo el 5% de los pacientes hipertensos presentan hipertensión secundaria.

III.1.1. Prevalencia de la HTA en México.

De las enfermedades crónicas no transmisibles (Figura 2), la diabetes y la HTA son la principal causa de mortalidad en adultos a nivel mundial. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cantidad de personas con hipertensión está en aumento y muchas de ellas desconocen que la padecen, de acuerdo a estas cifras 1 de cada 3 latinoamericanos sufre hipertensión arterial. En un informe elaborado por la OMS con motivo de Día Mundial de la Salud en el 2013, llamado "Información general sobre Hipertensión en el mundo. Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de la salud pública mundial", señaló que, la hipertensión es la causa de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatías y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular.⁶

En el año 2016 el Instituto Nacional de Salud realizó la Encuesta Nacional de Salud de Medio Camino (ENSANUT MC), con el objetivo de dar seguimiento e identificar oportunamente el estado de salud y nutrición de la población. En dicha encuesta se

observó que la prevalencia de hipertensión en nuestro país fue del 25.5%, de los cuales el 40% desconocía que padecía esta enfermedad y sólo el 58.7% de los adultos con diagnóstico previo se encontraron en control adecuado. El diagnóstico previo suele ser mayor en mujeres que en hombres (70.5% y 48.6% respectivamente) y su prevalencia disminuyó un 7.8 % con respecto a los datos recabados en el año 2012.⁷



Figura 2. Principales enfermedades crónicas no transmisibles en el ser humano. Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son aquellas que no se pueden contagiar de un individuo a otro, son enfermedades de larga duración cuya evolución es generalmente lenta, desafortunadamente este tipo de enfermedades van en aumento debido al sedentarismo y la mala alimentación de la población.⁶

III.1.2. Factores de riesgo que predisponen a padecer HTA.

El aumento en el consumo de azúcar, la contaminación del aire, el ruido, el bajo peso al nacer, son factores de riesgo recientes en el desarrollo de la HTA, lo cual hace que la detección, el tratamiento y el control adecuado de la presión sanguínea en esta enfermedad, se esté convirtiendo en un reto muy grande a nivel mundial.⁸

En la mayoría de los países, incluyendo los desarrollados, la prevalencia de la HTA ha ido en aumento. Aumento que se le atribuye a factores como: el comportamiento, la urbanización, la mala alimentación, la obesidad, el estrés social, el sedentarismo, la inactividad, la edad, la alta ingesta de sodio, las dietas elevadas en grasas

saturadas, el tabaquismo, las dislipidemias, la diabetes y la ingesta elevada de alcohol (Figura 3).⁹

Factores de riesgo	
Modificables	No modificables
Tabaquismo	Edad superior a 45 años
Sobrepeso u obesidad	Antecedente familiar directo de: Hipertensión arterial, diabetes mellitus, Cardiopatía Coronaria (CC) o Enfermedad Vascular Cerebral (EVC).
Sedentarismo	
Hipercolesterolemia	
Hipertrigliceridemia	
Hiperuricemia	
Ingesta excesiva de sal	

Figura 3. Factores de riesgo que predisponen a padecer HTA. La mala alimentación y el sedentarismo están dentro de los principales factores que predisponen a padecer HTA, así como, desarrollar otro tipo de padecimientos como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperuricemia; y, aunque existen programas de salud para la atención de la población que presenta dichas enfermedades, la prevalencia de la enfermedad va en aumento, transformando en un reto aún mayor el diagnóstico y el tratamiento en la población afectada.⁹

La historia familiar también es un factor que predice significativamente el posible desarrollo de HTA en los descendientes familiares, sin embargo menos de la mitad de los casos de HTA son causados por cuestiones genéticas, además, los genes involucrados en el desarrollo de HTA en su mayoría están relacionados, directa o indirectamente, con la función renal y en particular con la reabsorción de sodio.¹⁰

La implementación de programas de educación, campañas de concientización, promover el bajo consumo de sal, generar un mayor número de medicamentos, la capacitación de técnicos, enfermeras, enfermeros o médicos para el tratamiento y manejo de la HTA; por parte de las organizaciones de salud, las sociedades médicas y la industria farmacéutica pudieran ayudar en el mejoramiento del control sobre la HTA.¹¹

III.1.3. Tratamiento: Farmacológico y no Farmacológico.

La prevención de la enfermedad es muy importante, principalmente para evitar lesiones mayores en las personas con HTA, de esta manera, disminuir el índice de morbilidad y mortalidad general. La HTA es tratada de dos maneras, de forma farmacológica y no farmacológica, aunque normalmente lo que se aplica es una combinación de ambas. El tratamiento no farmacológico implica un cambio de hábitos, principalmente alimenticios. Y el tratamiento farmacológico involucra el consumo de fármacos, que por lo general actúan sobre enzimas que están relacionadas con alguna ruta metabólica que regula la presión arterial en el organismo.

La evolución de la HTA depende principalmente de su detección temprana y del tratamiento que se le aplique al paciente. Por lo general, la enfermedad es silente en sus inicios, aumentando las probabilidades de desarrollar una patología secundaria, de tal manera que si no se recibe un tratamiento adecuado, se puede ocasionar daños en el corazón, los vasos sanguíneos, el cerebro, los ojos y los riñones. El tratamiento adecuado y el cambio en el estilo de vida, deberían ayudar a reducir la presión arterial hasta valores normales. De hecho, para que el tratamiento tenga éxito, es fundamental que el paciente colabore cambiando sus hábitos de vida y tomando su medicamento.¹²

Hay siete grupos principales de anti-hipertensivos; los beta bloqueadores, los diuréticos, los inhibidores de la ECA, los bloqueadores de los receptores AT-1, los calcio antagonistas, los vasodilatadores y los medicamentos de acción central. En

general, los cinco primeros son anti-hipertensivos muy eficaces, tienen pocos efectos secundarios y ya han sido probados en diferentes estudios en los que han demostrado su efectividad reduciendo la morbilidad y mortalidad en los pacientes hipertensos. Los dos últimos grupos se utilizan en situaciones muy especiales, debido a que, tienen más efectos indeseables y los vasodilatadores pueden ser útiles solo en la terapia combinada.¹³

III.2. Los receptores de potencial transitorio (TRPs).

Los avances en la biología celular, la genética clásica, los avances en bioquímica y las técnicas fisiológicas han mejorado el entendimiento de las funciones celulares básicas y han permitido descubrir nuevas funciones de una gran variedad de proteínas celulares.

Un ejemplo de esto, son los receptores de potencial transitorio (TRPs),¹⁴ que corresponden a una familia de canales iónicos no-selectivos a cationes, y que inicialmente se creía funcionaban exclusivamente en la membrana plasmática regulando el flujo transmembranal de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , y Mg^{2+} . Sin embargo se han realizado estudios donde se han encontrado otras funciones atribuidas a éstos canales proteicos. Estos canales fueron descubiertos en el fotoreceptor de la mosca *Drosophila melanogaster*, aunque también han sido encontrados en los vertebrados, expresándose en varios tejidos y tipos celulares.¹⁵

La familia de los TRP está formada por 28 complejos proteicos, divididos en 6 subfamilias: canónica (TRPC), Vaniloide (TRPV), Melastatina (TRPM), policistina (TRPP), Mucolipina (TRPML) y Anquirina (TRPA).¹⁶ De las principales funciones

con las que se relaciona a esta familia de transportadores, son la respuesta a estímulos ambientales como la temperatura, los cambios de pH, la osmolaridad, la fuerza mecánica y el dolor.¹⁷ Sin embargo, la lista de funciones no relacionadas a estímulos sensoriales ha estado creciendo rápidamente.¹⁸

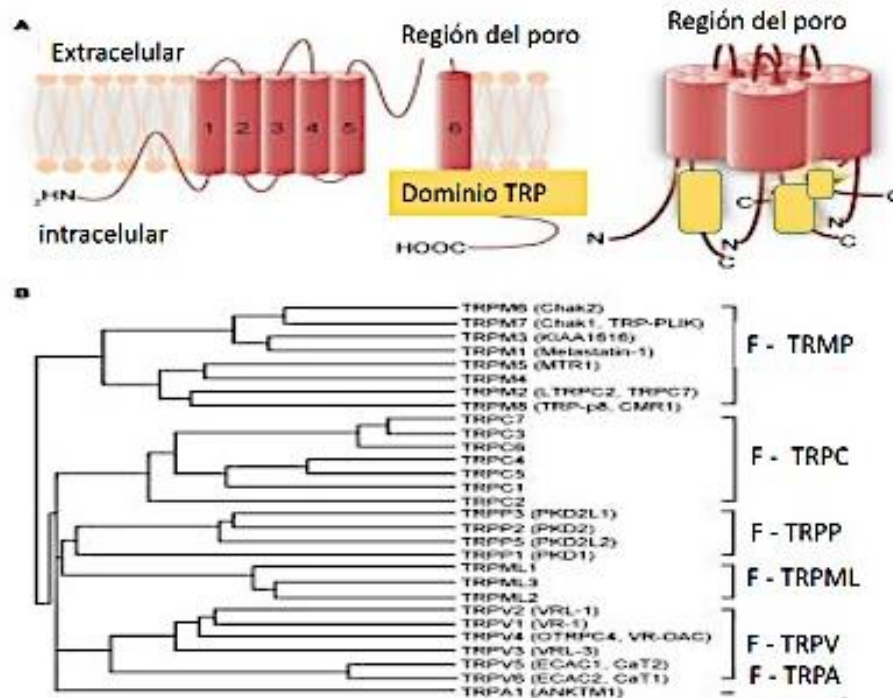


Figura 4. Estructura y árbol filogenético de los TRPs en mamíferos. (A) Estructura transmembranal, en el lado izquierdo y en el derecho se observa la estructura cuaternaria de los canales TRP. Los TRP tiene 6 dominios transmembranales, la región del poro localizada entre el quinto y sexto dominios y el dominio TRP en el extremo carboxilo terminal. (B) Árbol filogenético de los canales TRP estructurado en base a su homología.²⁰

Los TRPs son complejos proteicos, homo o hetero-oligómeros formados por la asociación de cuatro subunidades alrededor de un eje de simetría central que coincide con el poro iónico (Figura 4). Cada subunidad está formada por 6 segmentos transmembranales (S1-S6), un lazo hidrofílico entre el quinto y sexto segmento transmembranal que forma al poro iónico y dos dominios intracelulares en los extremos amino y carboxilo terminales.¹⁹ La región amino terminal está

constituida por dominios de unión a anquirinas que participan en la interacción con proteínas citosólicas favoreciendo de este modo la formación de complejos proteicos. El dominio carboxilo terminal tiene una región que interacciona con fosfoinosítidos y proteínas reguladoras.²¹

III.2.1. La subfamilia Vaniloide (TRPV).

Los canales TRPV están formados por siete dominios hidrofóbicos, seis de los cuales cruzan la membrana (S1–S6), mientras que el séptimo dominio, junto con el carboxilo y amino terminales se localizan hacia el interior de la célula.²² Las subunidades que constituyen a los TRPV pueden ser homotetrámeros o heterotetrámeros.²³ La región del poro (Figura 5) se localiza entre los segmentos 5 y 6 y es la responsable de la selectividad a cationes por parte del canal, por ejemplo TRPV5 y TRPV6 tienen una alta sensibilidad a calcio, también se ha visto que la región del poro es la responsable de su activación por temperatura.²⁴ La región amino-terminal de los canales TRPV contienen seis repeticiones de anquirinas, conocidas colectivamente como el dominio de anquirinas, este dominio le permite a los canales de los TRPV un adecuado funcionamiento del canal, se requiere para la tetramerización y para las interacciones proteína-proteína.²⁵

Por otro lado, el carboxilo-terminal también está relacionado con la tetramerización, el tráfico a través de la membrana y la sensibilidad a la temperatura,²⁶ contiene un dominio hidrofóbico conservado, denominado como el dominio TRP el cual, contiene la secuencia consenso, WKFQR, donde W esta conservado en todos los integrantes de la familia TRP; el dominio TRP está asociado con la regulación de

PIP2, la tetramerización, y la sensibilidad a lidocaína, capsaicina y temperatura del TRPV1.²⁷

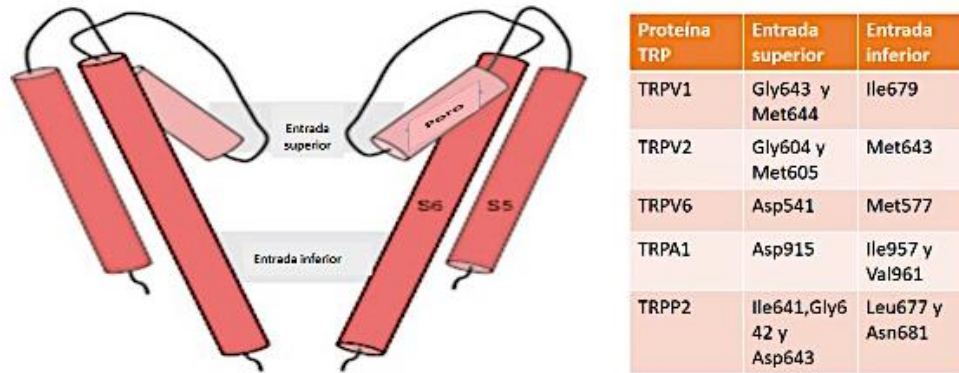


Figura 5. Representación esquemática del poro que se forma en los canales TRP, donde se observan las dos regiones que constituyen la región de apertura. Los residuos que forman los dos sitios del canal se muestran en la tabla adyacente.²⁸

Los receptores de potencial transitorio vaniloides (TRPV) recibieron ese nombre debido a que se activan con capsaicina, una molécula similar a los compuestos vaniloides, de hecho, estos canales fueron originalmente conocidos como VR1 y se regulaban por el ingrediente activo del chile (la capsaicina), por niveles de temperatura elevados (mayores a 42°C) y por protones.²⁹ Debido a la similitud estructural a otros canales TRP fue que se le nombro a esta familia TRPV1, subsecuentemente otros 5 miembros adicionales de esta familia fueron clonados y llamados TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 y TRPV6.³⁰

Inicialmente se pensó que todos los miembros de la superfamilia TRPV eran sensibles al calor como TRPV1, pero diferentes estudios han mostrado que, aunque TRPV2-6 tienen más del 50% de homología en su secuencia con TRPV1, no todos responden a la temperatura como estímulo. Además, TRPV1-4 tienen poros no selectivos a cationes mientras que TRPV5 y TRPV6 son altamente selectivos a

calcio.³¹

III.2.2. Características estructurales y bioquímicas del receptor TRPV1.

El primer miembro descrito de la familia vaniloide fue el TRPV1, este canal es altamente permeable a calcio y fue descrito en 1997, se expresa en un amplio rango de tejidos como, el tronco encefálico, cerebro medio, el hipotálamo, el sistema límbico,³² los nervios sensoriales vágales y espinal, el estómago, el corazón y el tejido adiposo.^{33,34,35}

Los canales TRPV1 están formados por cuatro subunidades idénticas localizadas en la membrana plasmática, cada subunidad tiene un grupo amino-terminal, una región transmembranal y un carboxilo terminal, con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa (Figura 6). El amino-terminal tiene su dominio de seis subunidades de anquirinas, el cual en su estructura terciaria forma seis alfa-helices conectadas por Loops. En el amino-terminal, existen sitios de fosforilación para protein cinasas de los cuales el aminoácido S116 es uno de los sitios más importantes en cuanto a la funcionalidad del canal. Una sección de unión conecta el amino-terminal a la región transmembranal vía el segmento pre-helicoidal (pre-S1), que se encarga de unir las subunidades que forman al TRPV1.³⁶

La capsaicina que interaccionan con los segmentos S3 y S4, y los protones (H⁺) interaccionan con los segmentos S5 y la región entre los segmentos S5-S6.³⁷

La región transmembranal de cada subunidad del TRPV1 está formada por 6 segmentos helicoidales (S1-S6), donde S1-S4, constituyen el dominio sensible a

voltaje y, S5-S6 son quienes forman el poro del canal. Las hélices S1-S4 están conectadas a S5-S6 por un segmento de unión, y actúan como un eje que permite a los segmentos moverse, contribuyendo a la apertura del poro y por lo tanto a la activación del TRPV1. La región transmembranal, también posee diversos sitios de unión a diferentes ligandos, como por ejemplo, los compuestos vaniloides.

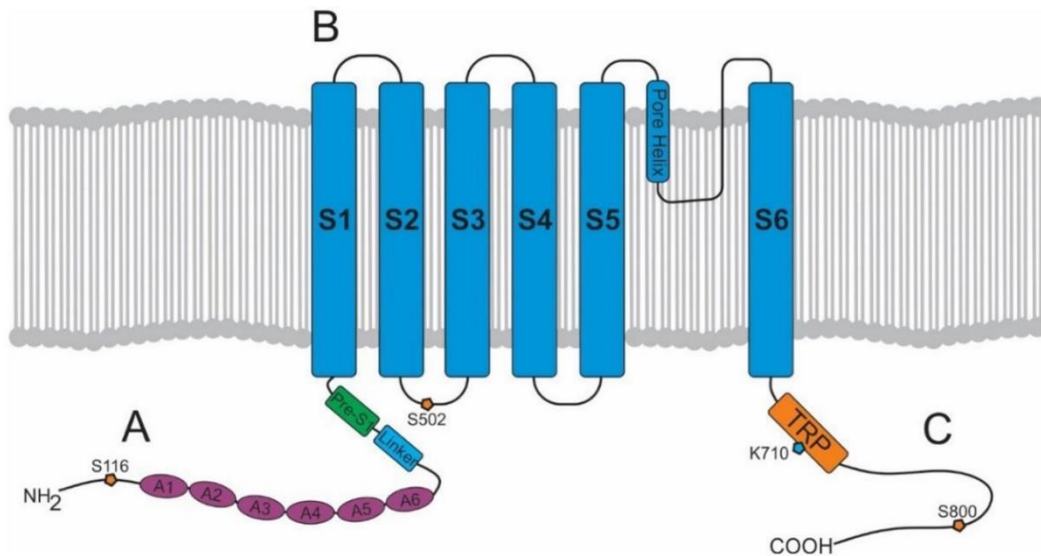


Figura 6. Estructura del TRPV1 donde, (A) corresponde a la región del amino-terminal con su dominio de anquirinas, (B) la región transmembranal con 6 cruces (S1-S6) y, (C) el carboxilo terminal, con la región TRP y los sitios de unión a PKA, PKC, PIP2 y calmodulina.³⁷

Finalmente, el carboxilo terminal está formado por el dominio TRP (TRP-D) el cuál interactúa con la sección pre-S1, lo que sugiere una función estructural de este sitio. Después del dominio TRP, existen varios sitios de fosforilación sensibles a proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC), y sitios de unión a calmodulina y a fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP2).³⁸

III.2.3. Activadores y regulación del TRPV1.

El TRPV1 se activa por diferentes estímulos moleculares o externos al organismo como son el calor, el pH (< 5.9), el compuesto irritante del chile (la capsaicina), los compuestos sulfurados derivados del ajo (la alicina), derivados de la pimienta negra (la peperina), iones extracelulares como Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, el ATP, el Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), el óxido nítrico, el gingerol del jengibre, las toxinas derivadas del veneno de las arañas y las medusas son también agonistas de los TRPV1.^{39,40}

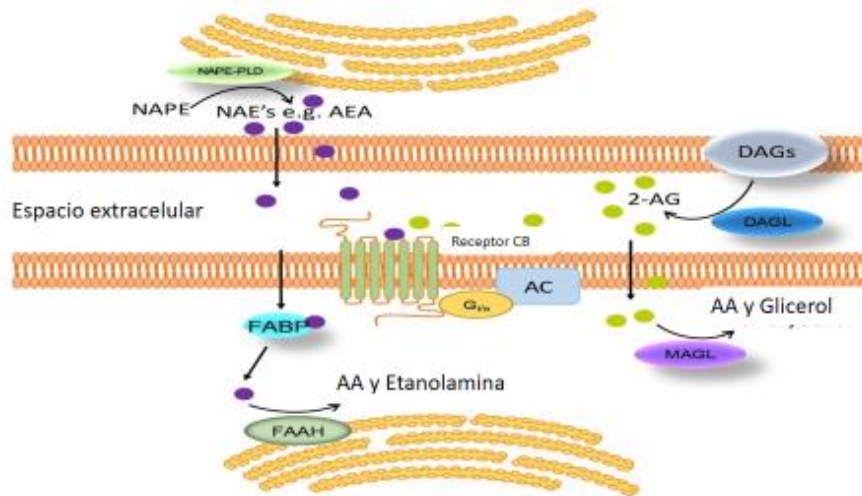


Figura 7. Representación esquemática de la síntesis, degradación y mecanismo de acción de un endocanabinoide sobre el receptor canabinoide. El compuesto endovaniloide debe producirse en cantidad suficiente para generar la activación del receptor TRPV1, la síntesis y rompimiento del mismo debe ser muy cercano al receptor.⁴¹

Existen también agonistas endógenos denominados endovaniloides, un endovaniloide es sintetizado y liberado en suficiente cantidad para estimular la respuesta del TRPV1 por interacción directa (Figura 7), el endovaniloide debe ser de vida media corta, de tal manera que, el mecanismo de síntesis y rompimiento de los endovaniloides debe ser muy cercano al TRPV1. Dado que los sitios de unión a

ligandos endógenos de los TRPV1 son intracelulares, significa que el ligando es sintetizado dentro de la célula o existe un mecanismo de transporte específico hacia la célula para cada ligando.^{41, 42}

Tres diferentes clases de lípidos se conocen como activadores del TRPV1, las N-acil-etanolaminas (AEA), algunas lipooxigenasas que intervienen en la ruta del ácido araquidónico, la N-acil-dopamina (N-araquinodildopamina, N-oleodopamina) y los linfocitos B del tejido adiposo (células B1) que regulan la respuesta inflamatoria local y producen leucotrienos, como el leucotrieno B4 que también es agonista del TRPV1.⁴³

Los cambios de pH activan al receptor aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular y la despolarización de la membrana. El Ca^{2+} también funciona como segundo mensajero activando rutas de señalización como la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa dependiente de calmodulina (CAMKII) quienes fosforilan al TRPV1, regulando su función. La mayoría de estos agonistas reducen el umbral de activación térmica del receptor desde 42°C a 35°C , activando el receptor a temperatura corporal y generando hiperalgesia.⁴⁴

III.2.4. Relación entre el receptor TRPV1 y la Hipertensión Arterial.

La HTA es un padecimiento que involucra diferentes rutas metabólicas, de hecho diferentes estudios han tratado de explicar el papel que juega cada ruta en el desarrollo de la hipertensión. En la patología de esta enfermedad, se observa el desarrollo de la inflamación de las arterias y los vasos sanguíneos, que se extiende como un remodelado vascular y que da como resultado la disminución de flujo en el

lumen de las arterias y los vasos sanguíneos, ocasionando que el corazón tenga un aumento en su trabajo cardiaco, bombeando la sangre con más fuerza y aumentando la presión sanguínea.

Se han descrito, diferentes mecanismos que intervienen en ese proceso inflamatorio, uno de esos mecanismos está ligado a la activación del receptor TRPV1 (Figura 8). Como ya se ha mencionado, este receptor se expresa en diferentes tipos celulares y se ha detectado en las células endoteliales vasculares, donde se ha descrito que es capaz de activar enzimas como la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Estudios recientes relacionan la actividad del TRPV1 como un atenuante de la respuesta inflamatoria, sin embargo aún se desconoce el mecanismo específico, datos experimentales han demostrado el efecto protector del receptor TRPV1, relacionándolo con la disminución de la inflamación en células endoteliales de cordones umbilicales de ratones hipertensos, a través de la activación de la vía $Ca^{2+}/PI3K/Akt/eNOS/NO$.⁴⁵

Otros reportes indican que este receptor está involucrado con la regulación del estrés oxidativo,⁴⁶ y que el aumento de la concentración de radicales libres es capaz de bloquear los canales TRPV1, sugiriendo la existencia de un ciclo entre la producción de radicales libres y el bloqueo del receptor TRPV1.⁴⁷ Por lo anterior es evidente el papel protector del receptor TRPV1 en el tejido cardiaco, aunque se ha encontrado también que está asociado a la hipertrofia cardiaca es más fuerte la evidencia que señala el papel protector del receptor en el tejido cardiaco y la hipertensión. Aunque el mecanismo exacto de esta protección no ha sido bien descrito aun.

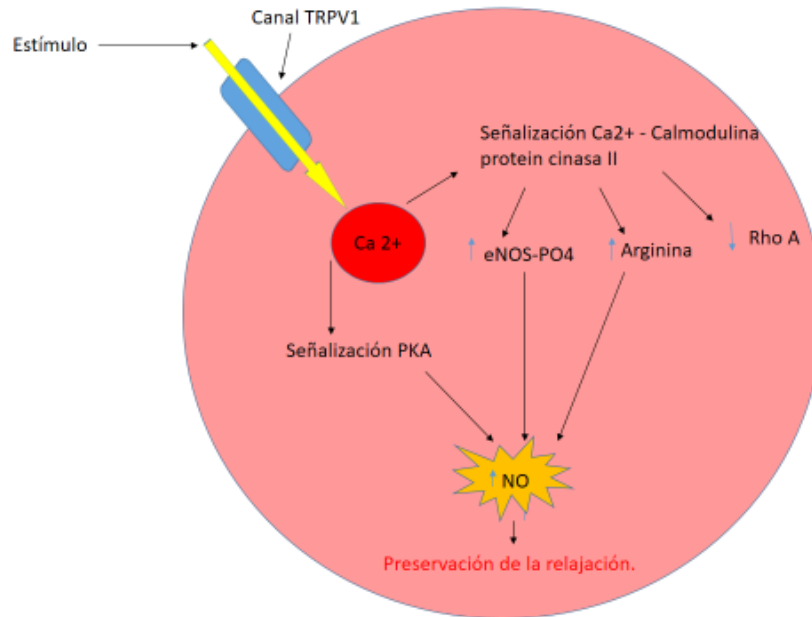


Figura 8. El papel del receptor TRPV1 en la hipertensión. De acuerdo con estudios recientes, la activación del receptor TRPV1 genera un influjo de Ca^{2+} , el cual a su vez activa otras vías de señalización, una de ellas genera el aumento de expresión de la enzima eNOS- PO_4 , lo cual tiene como consecuencia un aumento en la concentración de NO y así favorecer la relajación de las células musculares lisas vasculares, progresando esta condición a las células vasculares del musculo liso vascular a través de la activación de los canales de K^+ y la despolarización celular.⁴⁸

III.2.5. La capsaicina como activador exógeno del receptor TRPV1.

La capsaicina fue aislada en 1876, su estructura determinada en 1919 y fue sintetizada en 1930.^{49,50,51} La capsaicina, la dihidrocapsaicina, la nordihidrocapsaicina, la homocapsaicina y la homodihidrocapsaicina forman a los capsaicinoides, de los cuales, la capsaicina y la dihidrocapsaicina constituyen el 90% del total de capsaicinosides encontrados en la mayoría de las frutas pertenecientes al género *Capsicum* (Figura 9).⁵²

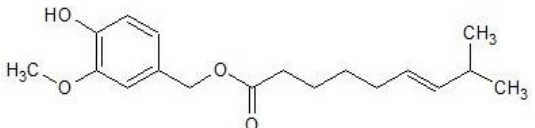
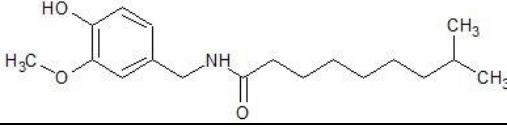
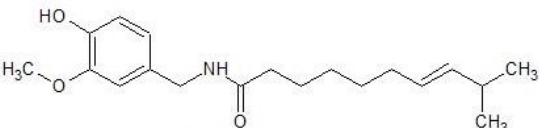
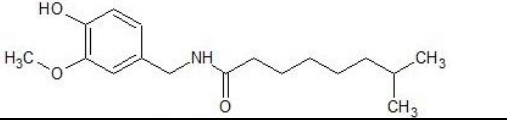
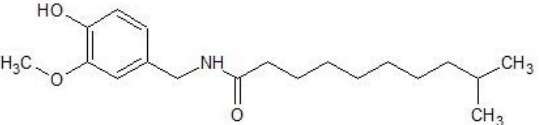
ANILLOS VANILOIDES COMUNES	
Capsaicina	
Dihidrocapsaicina	
Homodihidrocapsaicina	
Nordihidrocapsaicina	
Homocapsaicina	

Figura 9. Estructura de los capsaicinoides más comunes. Todos los capsaicinoides tienen un anillo estructural en común, sin embargo todos difieren en unidades Scoville de pungencia.⁵¹

La capsaicina es una molécula lipofílica lo cual facilita su difusión a través de la membrana plasmática. Se ha demostrado en experimentos donde se silencia la expresión del canal con RNA de interferencia, que este silenciamiento disminuyó el efecto de la capsaicina sobre el TRPV1, observado en la disminución de la entrada de calcio y en la adipogénesis en los adipocitos 3T3-L1.⁵³ Aunque el TRPV1 fue primero descrito en las fibras nerviosas sensoriales, su presencia ha sido descrita en otros tejidos como los ganglios trigeminales, los ganglios de la raíz dorsal, las

neuronas, la vejiga urinaria, los testículos, los adipocitos, las células de músculo liso, células endoteliales, células b pancreáticas, hígado, corazón, músculo esquelético y riñón.⁵⁴

La capsaicina se une al TRPV1 del lado citosólico celular, a través de su sitio de unión específico y altera alostéricamente las propiedades del TRPV1, promoviendo la apertura del canal y permitiendo la entrada de Ca^{++} , esta entrada de calcio provoca un cambio en las propiedades eléctricas de la célula, permitiendo la liberación de neurotransmisores, como la sustancia P y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP). La literatura ha mostrado que la concentración de capsaicina donde se observa una mayor probabilidad de apertura del TRPV 1 está alrededor de 700 nM. El TRPV1 se ha identificado también en las células β pancreáticas y su activación se asocia con una mayor eficiencia en la secreción de insulina.

Otra de las funciones ampliamente estudiadas con respecto a la capsaicina y el TRPV1, es la sensación al dolor; una exposición a altas o a repetidas dosis de capsaicina produce desensibilización del TRPV1, generando analgesia. Además del tratamiento sobre el dolor, la capsaicina puede ser utilizada para tratar enfermedades como la obesidad o las enfermedades cardiovasculares, y se ha reportado que puede estar involucrada en los procesos antiinflamatorios, antiapoptóticos, anticancerígenos, antioxidantes y neuroprotectores, dándole a la capsaicina un gran poder benéfico sobre la salud en el ser humano.⁵⁵

III.2.6. La anandamida como el activador endógeno del receptor TRPV1.

Como ya se ha mencionado el receptor vaniloide TRPV1 es parte de una familia de canales, este receptor es un canal catiónico no-selectivo que integra múltiples estímulos nocivos y se asocia con la pato-fisiología de varias enfermedades, y que se activa por los compuestos vaniloide naturales, capsaicina y resiniferatoxina (RTX), el calor y el pH.⁵⁶

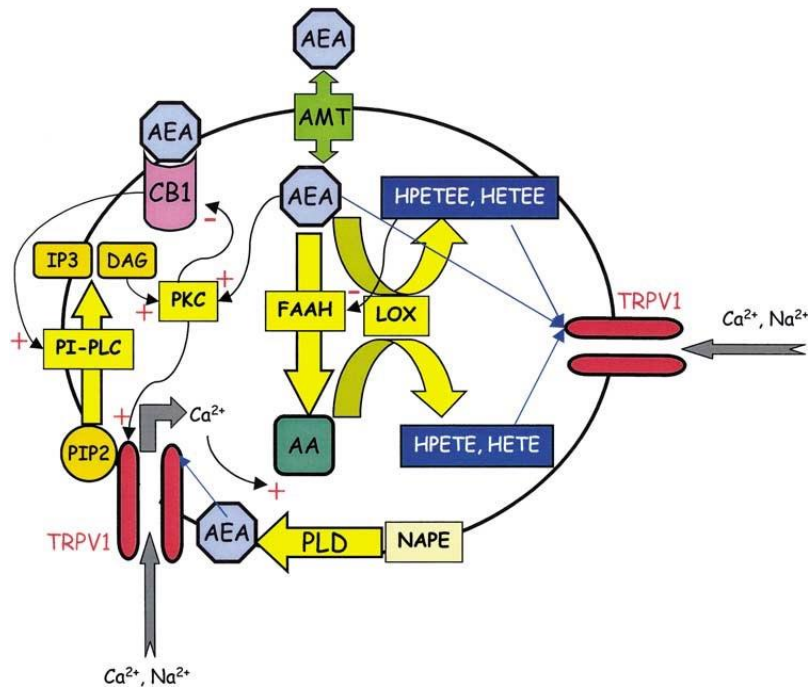


Figura 10. Mecanismo de acción de la anandamida (AEA) relacionada al receptor TRPV1. En el diagrama se explica cómo actúa la anandamida en los receptores celulares, la anandamida se difunde a través de la membrana gracias a la ayuda de un transportador de anandamida (AMT), el cual la ingresa y ésta puede interactuar directamente con el receptor TRPV1 despolarizando la membrana y permitiendo así el flujo de sodio y calcio a través del canal. En otra ruta, la anandamida se une al receptor canabinoide y actúa a través del fosfatidilinositol unido a la fosfolipasa C (PI-PLC), se estimula la activación de la proteína quinasa C (PKC) que de igual forma actúa sobre el receptor TRPV1 y despolariza la membrana para permitir el flujo de sodio y calcio a través del canal.⁵⁷

Sin embargo, la capsaicina no es sintetizada en el organismo, el efector endógeno más conocido del receptor TRPV1 es la anandamida, un endocanabinoide (N-

araquinoil-etanolamida), debido a su habilidad por interactuar y activar a los receptores canabinoides CB₁ y CB₂. La anandamida es sintetizada en la célula como un compuesto poliinsaturado derivado del ácido araquidónico, su estructura muestra que no es un análogo vaniloide, y la interacción con el TRPV1 es altamente específica. Tiene una constante de inhibición (K_i) de aproximadamente 2 μM, muy similar al que tiene la capsaicina, lo cual le da una alta afinidad por el TRPV1. Aunque, a diferencia con la capsaicina, la anandamida tiene una menor potencia de acción sobre el receptor.⁵⁷

La anandamida es rápidamente hidrolizada por la ácido graso amida hidrolasa (FAAH), generando ácido araquidónico y etanolamida. El ácido araquidónico es oxigenado por las lipooxigenasas, formando 12-(S)- y 15-(S)-HPETE, 5-(S)HETE y LTB₄ que son agonistas del TRPV1. La Anandamida también es sustrato de las lipooxigenasas, generando HPETE etanolamidas (HPETEE) y HETE etanolamidas (HETEE) que también son agonistas del TRPV1 (Figura 10).⁵⁸

La ácido graso amida hidrolasa (FAAH), es la enzima que se encarga de metabolizar a la anandamida, en ácido araquidónico y etanolamina. Se cree que la anandamida se une de la misma manera que la capsaicina al receptor TRPV1. Al observar ambas estructuras, se puede ver que sólo tienen en común el grupo urea y una cadena carbonada, a la cual se atribuye la unión al receptor TRPV1.⁵⁹

III.2.7. La capsacepina, un antagonista del receptor TRPV1.

Como ya se había mencionado la capsaicina es uno de los principales compuestos químicos del chile y promueve la apertura de canales selectivos a calcio y sodio, así

como, la salida de potasio en aquellas células sensibles al fármaco. La posibilidad de la existencia de una molécula antagonista específica para la capsaicina se investigó por mucho tiempo, utilizando al rojo de rutenio como antagonista, pero se demostró que este colorante no es específico para la capsaicina. Hasta que se descubrió la capsacepina, quien hasta la fecha es utilizado como un antagonista competitivo y específico de la capsaicina, específicamente sobre el canal TRPV1 provocando la inhibición de la respuesta que tiene el organismo a los compuestos vaniloides.⁶⁰

III.3. El Sistema Renina Angiotensina (RAS).

El organismo está formado por diferentes sistemas y órganos, los cuales deben funcionar en sincronía para mantener al organismo. Uno de esos sistemas, corresponde al llamado eje renina-angiotensina-aldosterona o sistema renina-angiotensina-aldosterona, indispensable para el correcto funcionamiento del organismo (Figura 11).

Este sistema se encarga de mantener la tonicidad vascular regulando el volumen del líquido extracelular y la presión arterial. A través de este sistema el agua, la sangre, el plasma, la linfa y el líquido intersticial están finamente controlados para que órganos, como el corazón y el riñón, funcionen adecuadamente sin que exista algún desbalance entre ellos.⁶¹

Como lo indica el nombre, la renina y la angiotensina son dos componentes importantes del sistema, la renina es una proteína de 340 aminoácidos, secretada por las células granulares del riñón, el precursor de la renina es la prorenina, y

corresponde a una proteína de 406 aminoácidos, que es transformada proteolíticamente en el riñón por la enzima, neuroendocrino convertasa 1, y no-proteolíticamente en muchos tejidos por el receptor renina/prorenina. La renina se encarga de hidrolizar el angiotensinógeno en Angiotensina I. El angiotensinógeno es un miembro de la familia de Serpinas (SERPINA8). Los niveles de angiotensinógeno pueden aumentar por la presencia de corticosteroides, estrógenos, la hormona tiroidea y los niveles de Angiotensina II. La Angiotensina I, puede ser catalizada en los capilares pulmonares, las células endoteliales y las células epiteliales del riñón, por acción de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), esta enzima es una carboxipeptidasa, que transforma la Angiotensina I en Angiotensina II.⁶²

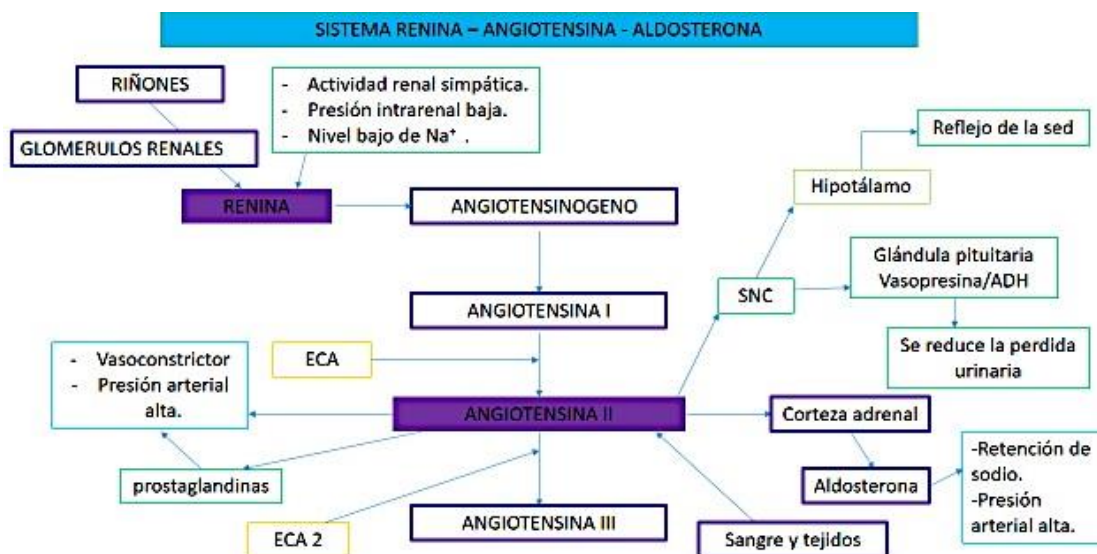


Figura 11. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. La renina es sintetizada en el riñón y los glomérulos renales, es una aspartilproteasa encargada de hidrolizar el Angiotensinogeno en Angiotensina I (AngI), la cual es rápidamente hidrolizada por la enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) en Angiotensina II (AngII), éste último es el efector más importante del sistema, pues es un vasoconstrictor que funciona a través del SNC, la corteza adrenal donde actúa a través de la aldosterona, la sangre y los tejidos. Sobre la Ang II actúa la ECA2 que la convierte en Angiotensina III, sin embargo esta última tiene el 40 % de actividad presora en comparación con la Ang II.⁶¹

La activación del sistema renina-angiotensina es un importante mecanismo que

contribuye a que ocurra la disfunción endotelial, el remodelado vascular y la hipertensión.

III.3.1. Regulación de la HTA con el Sistema Renina Angiotensina

El Sistema Renina Angiotensina (RAS) lleva de conocerse alrededor de un siglo, desde que fue descubierta la renina por Tigerstedt y Bergman en 1898; este sistema requiere la interacción de múltiples órganos que involucran la producción hepática de angiotensinógeno que es transformado en Angiotensina I (Ang I) por la renina, una proteasa generada en el aparato yuxtaglomerular, seguido de un segundo rompimiento a Angiotensina II (AngII) por acción de la enzima convertidora de Angiotensina (ACE) localizada en la superficie del endotelio pulmonar. La producción de los múltiples componentes de RAS ha sido encontrada en una variedad de tejidos incluyendo el riñón.⁷⁰

Una inapropiada activación intrarenal de RAS se ha asociado como un importante mecanismo en padecimientos como la hipertensión y la enfermedad renal. Sin importar que se trate de estas, no hay una evidencia clara de un aumento en la actividad de la renina plasmática, la renina o la Angiotensina II; además, la participación de RAS es capaz de disminuir la presión sanguínea en presencia de supresores o una elevada actividad de la renina.⁷¹

Este sistema se encarga de mantener la tonicidad vascular al regular el volumen de líquidos extracelulares y la presión arterial, debido a que en este sistema el agua, la sangre, el plasma, la linfa y los líquidos intersticiales están estrechamente regulados por la acción pulsante del corazón y la acción de filtración del riñón. Como hemos

mencionado, cualquier daño en el funcionamiento de este sistema puede terminar en la alteración de la presión sanguínea, generando un padecimiento crónico o agudo y en algunos casos hasta la muerte.⁷²

III.3.2. Los receptores a Angiotensina II, AT1 y AT2.

La Angiotensina II es el principal efector del sistema renina angiotensina, a través de los receptores a Angiotensina II Tipo 1 (AT1) y Tipo 2 (AT2). Sin embargo, la activación de ambos receptores estimula diferentes mecanismos y/o vías de señalización y producen diferentes respuestas biológicas. Los efectos hemodinámicos y no-hemodinámicos de la Angiotensina II, a través del receptor AT1, incluyen su habilidad para regular la presión sanguínea, mantener el balance agua-electrolitos, promover la vasoconstricción, también se ha visto una regulación sobre el crecimiento celular que es directamente regulado por el receptor AT1 (Figura 12). Sin embargo, los efectos biológicos y funcionales regulados a través del receptor AT2 son aún, poco comprendidos. Varios estudios han enfatizado, que la activación del receptor AT2 se encarga de regular el desarrollo de los tejidos y órganos, así como, proporcionar de cierta manera, un mecanismo de contra-regulación de los efectos regulados por el receptor AT1.^{63, 64}

Los niveles fisiológicos de la hormona Angiotensina II (Ang II), se encargan de regular la presión sanguínea, la homeostasis de los fluidos corporales, así como mantener la homeostasis cardiovascular y renal debido a la activación del Receptor a Angiotensina II Tipo 1 (AT1 R), que es parte de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. La interacción entre el receptor AT1 y la Angiotensina II desencadenan diversos procesos celulares que contribuyen al desarrollo de

hipertensión y promueven daño en los órganos asociados a la hipertensión. De tal manera que, enfermedades como la hipertensión, la enfermedad arterial coronaria, la hipertrofia cardiaca, el daño cardiaco, la arritmia, el derrame cerebral, la nefropatía diabética, el corazón isquémico y las enfermedades renales están asociadas a la sobre estimulación del receptor AT1.⁶⁵

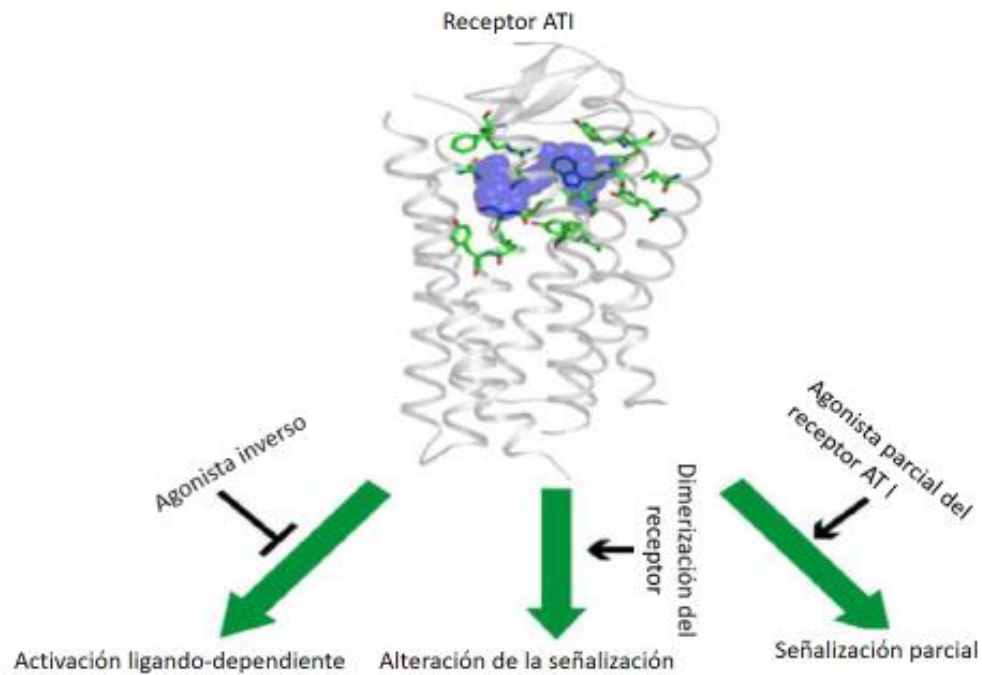


Figura 12. Estructura del receptor AT1. Este receptor cuenta con 7 dominios transmembranales y se encuentra acoplado a la proteína G reguladora, cuando los receptores AT1 presentes en el MLV son activados por el agonista y se acoplan a complejos que activan efectores que incluyen la PLC, PLA₂ y PLD. La activación de la PLC produce IP₃ y DAG. El IP₃ se une a sus receptores presentes en el retículo sarcoplásmico abriendo canales de Ca²⁺ que permiten en incremento de sus niveles intracelulares, desencadenando el mecanismo de contracción del MLV.⁶³

Todas esas patologías pueden ser tratadas con fármacos bloqueadores específicos para el receptor AT1, conocidos como bloqueadores de los receptores de Angiotensina II (ARBs). Los ARBs son moléculas de bajo peso molecular no-peptídicas con una alta especificidad al receptor AT1, existen ocho tipos de ARBs que son utilizados como antihipertensivos y que funcionan como inhibidores

competitivos de la Angiotensina II con el receptor AT1.

El losartan, candesartan, olmesartan, valsartan, ibersartan, comparten una estructura común y se les conoce como bifenil-tetrazolio ARBs. El Azilsartan es derivado del candesartan por sustitución del oxidazolio por tetrazolio. El Telmisartan y el eprosartan tienen diferencias estructurales comparados con el bifenil-tetrazolio. En particular, el Telmisartan contiene un grupo carboxilo en lugar del tetrazolio en la posición 2' del grupo bifenilo. Los ARBs se clasifican de acuerdo a su patrón inhibitorio, que se determina de acuerdo a una curva de concentración con Angiotensina II, y la velocidad de disociación del receptor. Los ARBs bifenil-tetrazolio son los fármacos más utilizados para el tratamiento de la hipertensión y enfermedades cardiovasculares.⁶⁶

El receptor a Angiotensina II Tipo 2 (AT2 R) ha sido reconocido como parte integral de la protección ejercida por el Sistema renina-angiotensina. Y aunque comparte con el receptor AT1 el mismo ligando, Angiotensina II, promueve diferentes y a menudo efectos opuestos a los que lleva a cabo el receptor AT1 (Figura 13).

El receptor AT2 es uno de los componentes clave en la regulación de la nefrogénesis. La expresión del receptor AT2 es alta cuando hay daño agudo en el riñón y disminuye en la enfermedad renal crónica. La estimulación del receptor AT2 con agonistas endógenos como la Angiotensina II o agonistas exógenos provoca un aumento en los niveles del receptor AT2, ECA2, Ang (1-7) y la expresión del receptor MAS, así como la disminución del receptor AT1, ECA y la expresión de renina.⁶⁷

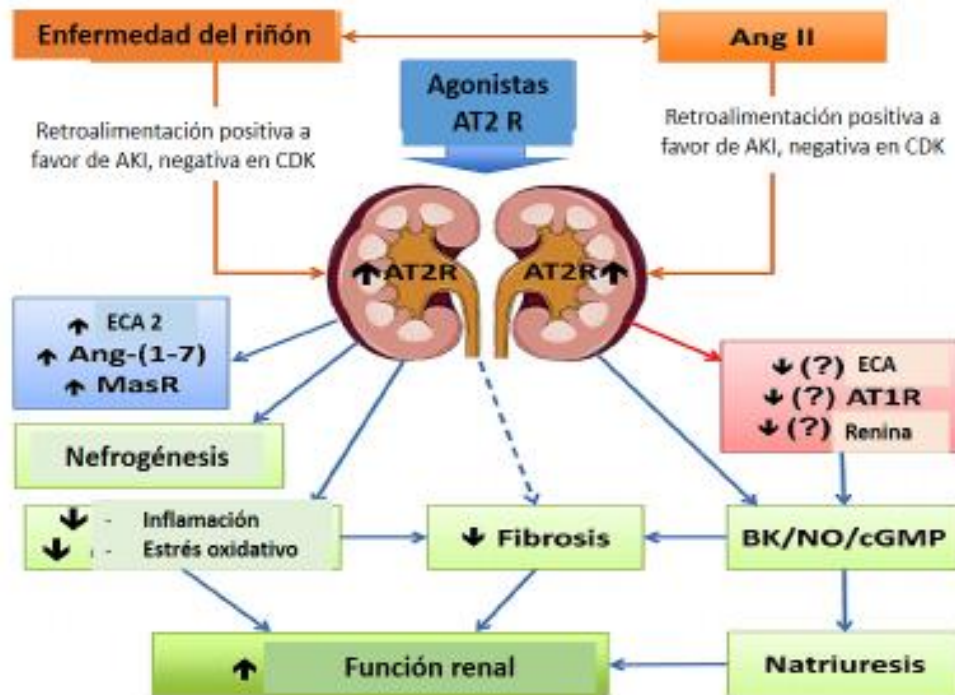


Figura 13. Mecanismos que involucran la protección renal regulada por el receptor AT2 en la enfermedad renal. En la enfermedad del riñón los niveles del receptor AT2 se encuentran elevados ya que es capaz de antagonizar los efectos del receptor AT1 a través de la producción de sustancias vasodilatadoras, la inhibición del crecimiento y la proliferación de células por inducción de la apoptosis, aumenta la concentración de la ECA2 y la producción de Ang- (1-7) y el receptor MAS. Así como también favorece la nefrogénesis y disminuye la inflamación y el estrés oxidativo que conlleva a una disminución de la fibrosis y a un aumento de la función renal.⁶⁷

En el corazón, el receptor AT2 está presente en los fibroblastos, los miocitos y las células endoteliales, y está regulado de diferentes maneras, dependiendo del tiempo después de un daño. Por ejemplo, una semana después de un infarto al miocardio, la expresión del receptor AT2 en el corazón de una rata se ve aumentado y se localiza con las células T inflamatorias y las células progenitoras en la zona periférica al infarto.⁶⁸

Desde que se describió el receptor AT2 en 1999, muchos avances se han llevado a cabo tratando de explicar su función protectora, en tejidos dañados principalmente, a pesar de las dificultades para evaluar su papel fisiológico en el tejido sano o

durante el desarrollo fetal, si se ha observado su papel benéfico en enfermedades cardiovasculares y renales.⁶⁹

III.4. Papel del Proliferador Peroxisomal tipo gamma (PPAR γ) en la HTA.

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), son factores transcripcionales activados por ligando que pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares. Tienen un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, aunque también se ha demostrado su participación y protección en los efectos vasculares causados por la diabetes, la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto al miocardio, debido a que se ha descrito que tiene una función antiinflamatoria, antiaterogénica y antioxidante.⁷³

Tras la interacción con su ligando, los PPARs se translocan al núcleo, donde se dimerizan con el receptor retinoide X (RXR), esos heterodímeros regulan la transcripción de una serie de genes que tienen en su promotor una secuencia llamada elementos de respuesta a PPAR, donde los heterodímeros interaccionan directamente. Los ligandos naturales de los PPARs incluyen a los ácidos grasos insaturados y las prostaglandinas.⁷⁴

En el humano, se han descrito tres isoformas de PPARs, codificadas por diferentes genes: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . El PPAR α se expresa principalmente en tejidos con alta actividad metabólica, como el hígado, los túbulos proximales del riñón, la grasa café, el corazón y el músculo esquelético;⁷⁵ y los genes que regulan son principalmente los relacionados con la β -oxidación, la proteína transportadora de ácidos grasos, la traslocasa de ácidos grasos, la lipoproteína lipasa y las

apoproteínas A-I y A-II; PPAR α es activado por derivados del ácido fíbrico (fibratos); de tal manera que, la activación del PPAR α promueve la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos, disminuyendo los niveles de triglicéridos en plasma y aumentando los niveles de HDL-C.⁷⁶

La expresión de PPAR β/δ es ubicua, con relativos niveles altos en músculo esquelético y macrófagos; su activación provoca un aumento en la oxidación de ácidos grasos en los músculos y mejora la sensibilidad a la insulina en modelos animales resistentes a insulina. También se ha observado que la activación de PPAR β/δ , en las células esponjosas de macrófagos disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa, aumenta la β -oxidación y la captación de ácidos grasos, así como inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias inducida por LDL. Los agonistas de este factor de transcripción están teniendo una gran importancia dado su papel en la obesidad, la diabetes y la aterosclerosis, se ha visto que normalizan el perfil lipídico en plasma, previenen la formación de células espumosas y reducen el riesgo cardiovascular, todo esto en modelos animales.⁷⁷

En el caso de PPAR γ , se expresa abundantemente en tejido adiposo y, en menor grado, en macrófagos y otros tipos celulares, y se encarga de regular la adipogénesis (el almacenamiento de lípidos) y la homeostasis de la glucosa. En el caso de PPAR γ , el gen que lo codifica tiene varios promotores y exones 5', lo cual da como resultado tres diferentes RNA mensajeros (PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3). La traducción de PPAR γ 1 y 3 resulta en tres proteínas idénticas, mientras que el producto de la traducción de PPAR γ 2 genera una proteína con 30 aminoácidos extra

en la región amino terminal.⁷⁸ Los activadores de este factor de transcripción, las tiazolindinedionas (TZDs), provocan la reducción de la inflamación y mejoran la sensibilidad a insulina; y se utilizan normalmente en la clínica para el tratamiento de la diabetes, aunque su potencial terapéutico puede ser mayor dado que presentan una actividad pleiotrópica (Figura 14).



Figura 14. Efectos pleiotrópicos de la activación de PPAR γ . Los efectos de los receptores activados por proliferadores peroxisomales del tipo gamma generan diversas respuestas en el organismo que no están relacionadas entre sí. Al activarse este receptor disminuye la señalización de Ang II y la señalización de Factor de Crecimiento transformante Beta (TGF-B) que regula la proliferación y diferenciación de algunos tipos celulares, disminuye la inflamación y la proliferación de células musculares lisas vasculares.⁷⁷

Los PPARs son grandes reguladores de la hipertensión, el efecto que tienen los agonistas de PPAR γ sobre la disminución de la presión sanguínea ha sido reportado por diferentes investigadores. Se ha observado que las TZDs disminuyen la expresión de los componentes del Sistema renina-angiotensina, básicamente el receptor a Angiotensina II Tipo 1 (AT1), en las células de musculo liso vascular y de manera dosis dependiente. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que los agonistas de PPAR γ tienen un efecto inhibitorio en la aldosterona sintasa inducida por Angiotensina II y en la secreción de aldosterona, también se ha observado que

los agonistas de PPAR γ suprimen a la fosfatidilinositol 3 kinasa y la MAP kinasa inducidas por Angiotensina II *in vivo*. Todos esos factores indican que la activación de PPAR γ tiene un papel muy importante en el control de la hipertensión.⁷⁹

III.5. Papel de la GTPasa pequeña Rho en la HTA.

Además de formar parte de la regulación de la organización del citoesqueleto y funciones celulares como la adhesión celular y la migración, se ha encontrado evidencia de la participación de la familia de GTPasas pequeñas llamadas Rho, también conocidas como proteínas G monoméricas, en diferentes funciones fisiológicas, uno de los mejores ejemplos, es su papel sobre el control de la presión sanguínea. La superfamilia de las GTPasas pequeñas comprende más de 100 proteínas estructuralmente relacionadas. Las GTPasas pequeñas son activas cuando tienen unido GTP e inactivas cuando contienen GDP, en su estado activo se unen efectores que regulan diferentes funciones biológicas, además de que son controladas por distintas clases de proteínas reguladoras.

La presión arterial es un parámetro fisiológico altamente regulado por diferentes mecanismos, que permanentemente ajustan la circulación sanguínea para el aporte de nutrientes y oxígeno a todos los órganos y tejidos del cuerpo dependiendo de su demanda.

Hay tres principales mecanismos de regulación de la presión sanguínea: la contracción de las arterias pequeñas, el control del volumen sanguíneo por el riñón y la regulación del gasto cardiaco.

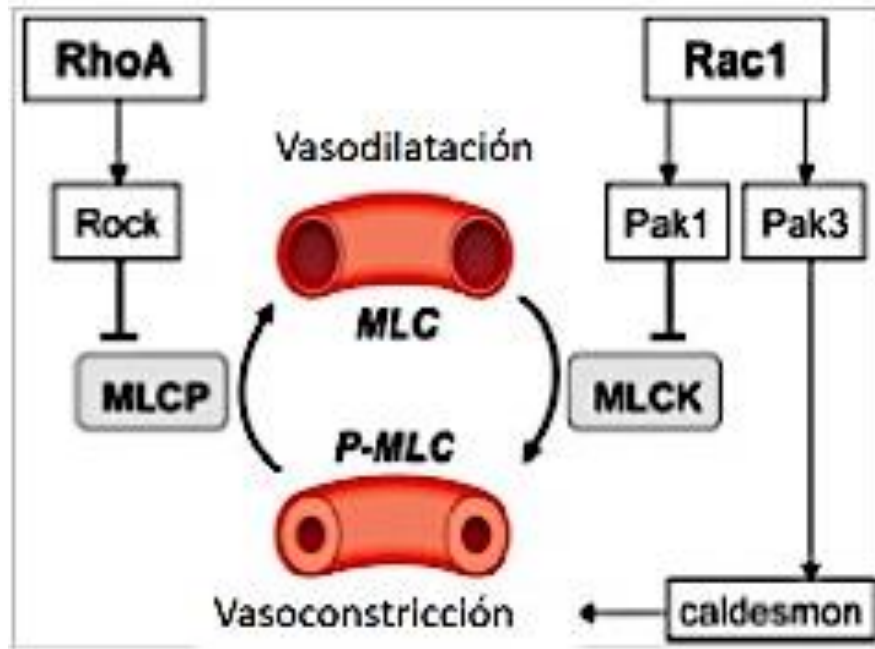


Figura 15. Papel de RhoA en la regulación de la contracción del músculo liso, el estado contráctil es determinado por el nivel de fosforilación de la cadena ligera de miosina (P-MLC), que es controlado por la actividad de las enzimas MLC kinasa (MLCK) y MLC fosfatasa (MLCP).⁸⁰

Las células del músculo liso vascular, localizadas en la capa media de las arterias son células altamente especializadas cuya principal función es contraerse y relajarse para modular el diámetro del lumen arterial, y por lo tanto controlar la resistencia del flujo sanguíneo y finalmente controlar la presión sanguínea. La vasodilatación y la vasoconstricción son procesos regulados por factores solubles locales, como los factores derivados del endotelio (óxido nítrico (NO), endotelina-1 (Et-1), tromboxano A2 (TxA2), etc), mediadores liberados de terminales nerviosas (noradrenalina) y por mecanismos neurohormonales (Angiotensina II (AngII), adrenalina). La contracción de las células del músculo liso vascular depende de la fosforilación de la cadena ligera de 20 kDa de la miosina (MLC). Esta cadena es fosforilada por la MLC kinasa dependiente de Ca^{++} -calmonulina (MLCK) activada

por un aumento en la concentración de Ca^{++} , y se defosforila por la MLC fosfatasa (MLCP) independiente de Ca^{++} (Figura 15).⁸⁰

Los vasoconstrictores como la Ang II, la noradrenalina, la Et-1 o el TxA2, actúan por interacción con proteínas G acopladas a receptores, induciendo la contracción muscular y promoviendo el aumento citosólico del Ca^{++} así como aumentando la sensibilidad del aparato contráctil, principalmente inhibiendo la actividad de la enzima MLCP y provocando un aumento en los niveles de MLC fosforilada.

Diferentes estudios han demostrado que el efecto sensibilizador del Ca^{++} de los vasoconstrictores, se le atribuye a RhoA y su enzima blanco, Rho kinasa (Rock). Después de la activación de RhoA, Rock se encarga de fosforilar MYPT-1 la subunidad regulatoria de MLCP, inhibiendo su actividad.⁸¹

En particular, Rock 2 tiene una función primordial en la regulación de contracción del músculo liso vascular, a pesar de que Rock1 también se expresa en las mismas células. Como ya hemos hablado, la hipertensión se define como un nivel elevado y mantenido de presión arterial sistólica y/o diastólica y un mayor factor de riesgo para la morbilidad y mortalidad cardiovascular. La patogénesis de la hipertensión es multifactorial, su origen es aún desconocido y tanto la patogénesis de la hipertensión como el mecanismo básico del control de la presión sanguínea son aun insuficientemente entendibles (Figura 16).

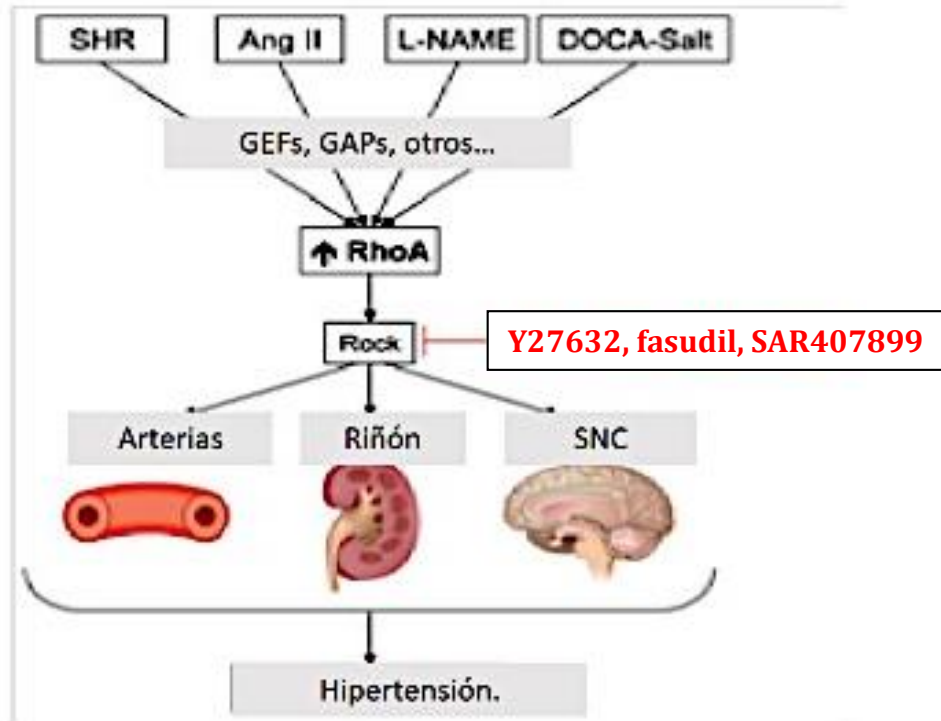


Figura 16. El aumento de la actividad de RhoA y Rock tiene un papel fundamental en la hipertensión, sin importar el modelo animal que sea utilizado (SHR, AngII, L-NAME o sal DOCA). Los inhibidores de Rock disminuyen la presión sanguínea y pueden actuar a nivel de las arterias, el riñón y el SNC.⁸¹

La demostración del papel causal de la señalización de RhoA/Rock en la presión sanguínea ha sido probada utilizando Y27632, el primer inhibidor descrito de Rock, la inhibición *in vivo* de Rock con Y27632 disminuye la presión sanguínea, lo cual se ha confirmado con el uso de otros inhibidores de Rock, o el fasudil y el SAR407899 en modelos animales que incluyen las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), la hipertensión inducida por Ang-II así como la hipertensión inducida con L-NAME. Análisis bioquímicos han demostrado el aumento en la actividad de RhoA y Rock en arteria de ratas SHR o ratas con hipertensión inducida, son responsables del aumento de la presión sanguínea, al parecer todos estos factores también dependen de la activación de RhoA/Rock, convirtiendo este sistema en un punto de convergencia de la patogénesis de la hipertensión.^{82,83}

III.6. El estrés oxidativo (EO) en la HTA.

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) son generados durante el metabolismo del oxígeno y se balancean a través de la velocidad de formación y eliminación de oxidantes. El estrés oxidativo es el resultado del desbalance entre la generación de especies reactivas a oxígeno y el sistema de defensa antioxidante. El estrés oxidativo está asociado a la disfunción endotelial, inflamación, hipertrofia, apoptosis, migración celular, fibrosis y angiogénesis, todo en relación con la remodelación vascular en la hipertensión.

Se ha demostrado que las especies reactivas a oxígeno tienen un papel muy importante en la patofisiología de la hipertensión. La vasculatura es una fuente rica de NADPH oxidasa la cual produce la mayoría de especies reactivas en la célula y juegan un papel importante en la disfunción renal y el daño vascular. Se ha demostrado que el aumento en el estrés oxidativo es el más importante regulador de daño endotelial en la patología de la hipertensión asociada al aumento de la producción de pro-oxidantes como es el peróxido de hidrógeno, la síntesis de óxido nítrico reducido y la disminución de la disponibilidad de antioxidantes y en la biodisponibilidad de NO (Figura 17).⁸⁴

El Óxido Nítrico es un gas inorgánico, un radical libre y un compuesto muy pequeño; su función en la biología vascular fue descrita alrededor de 1980. En los mamíferos es sintetizado endógenamente al transformar la L-arginina en L-citrulina.

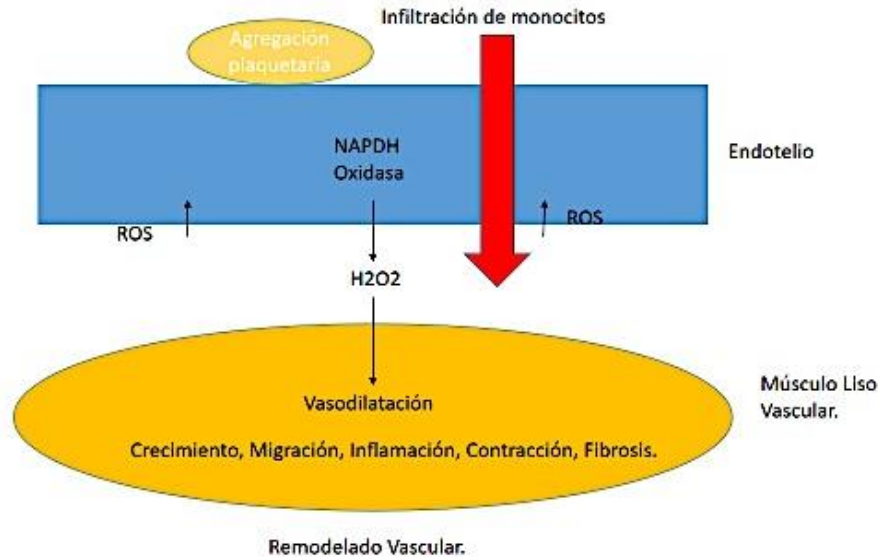


Figura 17. Generación de EROS en el endotelio vascular. La NADPH oxidasa genera especies reactivas de oxígeno como mecanismo de defensa ante microorganismos patógenos, existe un balance entre el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante del organismo, sin embargo, cuando ocurre un desbalance entre las vías involucradas ocurre el remodelado vascular que se caracteriza por crecimiento celular, migración celular, inflamación del endotelio, contracción y fibrosis.⁸⁴

En general, la reacción oxidativa involucra dos reacciones separadas de mono-oxigenación que utilizan el oxígeno molecular, al NADPH como donador de electrones y hemo proteínas; y al flavín mono-nucleótido (FMN), al flavín adenin dinucleótido (FAD), y al (6R-)5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactores. Las enzimas NOSs son una familia de enzimas que catalizan la producción de óxido nítrico a partir de L-arginina en el organismo; hay tres diferentes isoformas de NOS, la NOS neuronal (nNOS o NOS I), la NOS inducible (iNOS o NOS II) y la NOS endotelial (eNOS o NOS III). La nNOS y la eNOS son enzimas constitutivas, y se encargan de generar y liberar óxido nítrico en células en reposo, como son las células nerviosas y las células endoteliales, manteniendo así la regulación a largo plazo la transmisión sináptica y la regulación del tono microvascular.

El NO es una molécula que tiene las características de un neurotransmisor; tiene

actividad vasodilatadora, es estimulante de la síntesis de músculo liso vascular, es anti-agregante plaquetario, y está involucrado en enfermedades como hipertensión, shock séptico, inflamación y demencia, entre otras. Moncada y cols., demostraron en células endoteliales vasculares, que el aminoácido L-arginina es el precursor de la síntesis del NO. Debido a su naturaleza gaseosa, el óxido nítrico no puede ser almacenado en el interior de vesículas, en consecuencia, cuando una célula produce óxido nítrico, éste escapa a través de la membrana celular difundiendo a las proximidades. Esa misma propiedad de atravesar las membranas permite al óxido nítrico afectar a otras células sin necesidad de receptores en la superficie.⁸⁵

El endotelio de todo el organismo está profundamente involucrado en múltiples funciones, sintetizando, metabolizando y liberando un número de sustancias que ejercen efectos de modo autocrino, paracrino o epicrino. Entre estas sustancias se destaca el óxido nítrico, por su papel central y fundamental en varias funciones endoteliales, tales como la regulación del tono vasomotor, la inhibición de la actividad plaquetaria, el mantenimiento del balance entre los procesos de trombosis y fibrinólisis y la regulación del reclutamiento de células inflamatorias dentro de la pared vascular.⁸⁶

Una disminución en la biodisponibilidad de NO y de la enzima eNOS podría significar una reducción de la dilatación dependiente del endotelio (DDE), lo cual reduciría la actividad de los vasos sanguíneos y generaría complicaciones en los vasos sanguíneos y el corazón, desencadenando los primeros indicios de la hipertensión. Se ha demostrado que el remodelado vascular está directamente relacionado con la hipertensión, sin embargo se sabe, de igual forma, que el sistema

inmune participa con la generación de EROS como H_2O_2 y O_2 , los cuales son utilizados para eliminar a los microorganismos patógenos que ingresan al organismo, así como la acumulación de neutrófilos, macrófagos e TNF mediado a través de la activación de Interleucina 6 (IL-6), así, es posible observar la participación de diferentes sistemas en el remodelado vascular y en el desarrollo de HTA, razón por la cual a ésta enfermedad se le conoce como multifactorial.

Desafortunadamente, las investigaciones aún no han podido establecer la vía de desarrollo de la HTA, es por ello que en este trabajo se estudiaron dos sistemas fuertemente ligados a la regulación de la presión arterial en nuestro organismo y la posible relación que pudiera existir entre ellos a través de la expresión de enzimas y receptores más importantes de dichos sistemas en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar que fueron tratadas con L-NAME para inducirles hipertensión por inhibición de la enzima eNOS. Así, la activación del receptor TRPV1 a través de la capsaicina generó efectos sobre la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), los niveles de óxido nítrico (NO), la expresión del mismo receptor TRPV1, la expresión de los receptores de Angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) y algunos receptores que regulan al SRA como el proliferador peroxisomal tipo gamma ($PPAR\gamma$) y la GTPasa pequeña Rho.

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La hipertensión arterial es el principal factor de riesgo cardiovascular y afecta a casi la mitad de los hombres y a cuatro de cada diez mujeres a nivel mundial, es una enfermedad que se está colocando como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, sin que México sea la excepción, debido a su alta incidencia y a la falta de mecanismos de detección temprana. Entender y estudiar el o los mecanismos que pudieran estar involucrados en el desarrollo de la HTA, son de vital importancia. De tal manera que cualquier proceso, vía, fármaco o molécula relacionada con la regulación de la presión arterial y el control de la HTA, así como el análisis bioquímico, fisiológico o metabólico de cada uno de estos procesos o moléculas, con respecto a la dilucidación de la HTA, son muy importantes para el estudio y tratamiento de esta enfermedad. El estudio de proteínas como el canal TRPV1, que se creía involucrado en funciones diferentes a la actividad cardiovascular y por ende, diferentes a la hipertensión, ha estado proporcionando nuevos hallazgos para entender esta enfermedad. El TRPV1 se expresa principalmente en las poblaciones de neuronas aferentes primarias, esas neuronas se proyectan hacia el sistema cardiovascular y renal. Diversos estudios han mostrado también que este canal es expresado en la región del miocardio y perivascular, lo cual implicaría un posible papel del canal en los sistemas fisiológicos y fisiopatológicos involucrados en homeostasis cardiovascular, por lo que cualquier mecanismo de regulación que tenga un efecto sobre la función del TRPV1, pudiera estar contribuyendo a la patogénesis de enfermedades como la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, la aterosclerosis, la diabetes, la obesidad, la isquemia del

miocardio y el accidente cerebrovascular. Estudios recientes señalan al TRPV1 como un factor clave en la salud cardiovascular y la protección contra las lesiones cardiovasculares. Debido a la alta prevalencia en la hipertensión y los trastornos relacionados con ella, la posible participación del TRPV1 lo convierte en un blanco importante en la terapia contra enfermedades cardiovasculares. Así mismo es importante también estudiar a otros receptores que se encuentran ligados a la regulación de la presión arterial a través del SRA. Es por ello que queremos plantearnos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de la capsaicina y la capsacepina sobre la expresión de los receptores de Angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), los niveles de óxido nítrico (NO), la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), el proliferador peroxisomal tipo gamma (PPAR γ) y la GTPasa pequeña Rho en ventrículo izquierdo de ratas Wistar con hipertensión inducida por ingesta de L-NAME, vía activación del receptor TRPV1?

V. HIPÓTESIS.

Si la capsaicina y la capsacepina son moléculas que regulan la actividad de los receptores TRPV1 en el corazón, entonces en un modelo de rata hipertensa se observarán efectos sobre algunos receptores que regulan la actividad del Sistema renina-angiotensina como los receptores de Angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), el proliferador peroxisomal tipo gamma (PPAR γ) y la GTPasa pequeña Rho, así como la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y los niveles de óxido nítrico (NO).

VI. OBJETIVOS.

VI.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la activación del receptor TRPV1 con Capsaicina y Capsacepina sobre los receptores de Angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), el proliferador peroxisomal tipo gamma (PPAR γ) y la GTPasa pequeña Rho, así como la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y los niveles de óxido nítrico (NO), en ventrículo izquierdo de ratas hipertensas y normotensas.

VI.2. Objetivos Particulares.

- Inducir hipertensión arterial en ratas utilizando L-NAME como inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).
- Determinar los niveles de óxido nítrico en suero de ratas control e hipertensas en presencia de capsaicina y capsacepina.
- Determinar la expresión del receptor AT1 en los modelos de rata hipertensa y normotensa con capsaicina y capsacepina.
- Analizar el efecto de la capsaicina y capsacepina sobre el receptor AT2 en ratas hipertensas y normotensas.
- Analizar la expresión de la enzima eNOS en ratas normotensas e hipertensas en presencia de capsaicina y capsacepina.
- Determinar la expresión de PPAR gamma en ratas hipertensas y normotensas con capsaicina y capsacepina.
- Determinar el nivel de la GTPasa pequeña Rho en un modelo de rata normotensas e hipertensas en presencia de capsaicina y capsacepina.

- Analizar la expresión del receptor TRPV1 en un modelo de rata hipertensa y normotensa en presencia de capsaicina y capsacepina.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VII.1. Material biológico.

Los animales experimentales fueron Ratas Wistar macho de 4 meses de edad y 300 a 350 g de peso. Obtenidas después de la aprobación del Comité de ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Los animales se mantuvieron en condiciones de luz normal (12 horas luz-oscuridad), temperatura controlada ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y humedad controlada ($\pm 50\%$); se alimentaron *ad libitum*, con una dieta estándar (dieta certificada para ratas, Lab Diet 5026, PMI Nutrition International, Richmond, IN, USA) y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido por la SAGARPA.⁸⁷

VII.2. Material Químico.

Desoxicolato de sodio (DOC), 2-mercapto etanol, N-etil-maleimida (NEM), fenilmetano-silfonil-fluoruro (PMSF), protinina, leupeptina, Tris, TEMED, NaCl, la capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonamida), la capsacepina (N-(2-(4-clorofenil)etil)-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzacepina-2-carbotiamida) y el L-NAME (L-Nitro-arginina metil ester) fueron de Sigma Aldrich (St. Louis MO). El reactivo de Bradford, el marcador de peso molecular, el persulfato de amonio (APS) y el duodecilsulfato de sodio (SDS) fueron de Biorad (California USA). La acrilamida y bis-acrilamida fueron de IBI Scientific. La leche Svelty libre de grasa fue de Nestlé (Vevey Suiza). El Kit de quimioluminiscencia fue de Millipore (Temecula, CA). Los anticuerpos anti- AT1, anti-AT2, anti- PPAR γ , anti-Rho, anti-actina, anti-NOS3, y los

anticuerpos secundarios unidos a HRP fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA). El anticuerpo anti-TRPV1 fue de Sigma Aldrich.

VII.3. Grupos Experimentales.

Las ratas se dividieron en 8 grupos de la siguiente manera:

- **Grupo 1 (Normotenso):** sin tratamiento
- **Grupo 2 (Normotenso + Capsaicina):** se les administró capsaicina al día 36 por vía intraperitoneal (5mg/Kg de peso).
- **Grupo 3 (Normotenso + Capsacepina):** se les administró capsacepina al día 36 por vía intraperitoneal (4 mg/Kg de peso).
- **Grupo 4 (Normotenso + Capsaicina + Capsacepina):** se les administró capsaicina al día 36 (5mg/Kg de peso) a las 10:00 am y a las 11:00 am se les administró capsacepina (4 mg/Kg de peso), ambas por vía intraperitoneal.
- **Grupo 5 (Hipertensas):** recibieron un tratamiento con L-NAME durante 40 días para inducir hipertensión sistémica, en una concentración de 200 mg/L en el agua de bebida de los animales.⁸⁸
- **Grupo 6 (Hipertensas + Capsaicina):** recibieron un tratamiento con L-NAME durante 40 días para inducir hipertensión sistémica, en una concentración de 200 mg/L en el agua de bebida. En el día 36 del tratamiento se les administró capsaicina por vía intraperitoneal en una concentración de 5mg/Kg de peso.
- **Grupo 7 (Hipertensas + Capsacepina):** recibieron un tratamiento con L-NAME durante 40 días para inducir hipertensión sistémica, en una

concentración de 200 mg/L en el agua de bebida. En el día 36 del tratamiento se les administró capsacepina por vía intraperitoneal en una concentración de 4mg/Kg de peso.

- **Grupo 8 (Hipertensas + Capsaicina + Capsacepina):** recibieron un tratamiento con L-NAME durante 40 días para inducir hipertensión sistémica, en una concentración de 200 mg/L en el agua de bebida. En el día 36 del tratamiento se les administró capsaicina (5mg/Kg de peso) a las 10:00 am y a las 11:00 am se les administró capsacepina (4 mg/Kg de peso), ambas por vía intraperitoneal.

Notas:

- 1.- Todos los grupos tuvieron acceso libre al agua y a la comida.
- 2.- La capsaicina y capsacepina se diluyeron en una mezcla de etanol y agua a una relación 2:1.
- 3.- El tratamiento con L-NAME nunca fue suspendido en los grupos hipertensos.
- 4.- A los 40 días los animales se sacrificaron.

VII.4. Determinación de la presión arterial.

La presión arterial media se determinó en todos los grupos por un método no invasivo, utilizando un monitor de presión neumático colocado en la base de la cola de los animales determinando la presión al inicio y al final de los tratamientos.

VII.5. Extracción de ventrículo izquierdo.

El ventrículo izquierdo se extrajo del corazón de los animales sacrificados, el tejido fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -70°C hasta su uso.

VII.6. Extracción de proteína.

Los tejidos fueron homogenizados en un mortero con nitrógeno líquido hasta disgregar por completo el tejido, posteriormente se trasladó el polvo a un eppendorf y se adicionó un buffer de lisis modificado de RIPA⁸⁹ constituido por 25mM HEPES, 10mM EGTA, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 10% Glicerol, 1% Triton-X100, pH= 7.5; 2.5mM PMSF, 10ng aprotinina, 10ng leupeptina, 1.25 mg/ml N-etilmaleimida, 7 mg/ml desoxicolato de sodio. Se utilizó una jeringa de insulina para hacer pasar el lisado celular varias veces a través de una aguja y asegurar la ruptura celular total. Los tubos se colocaron en un agitador bidimensional a 4°C durante 30 min. Posterior a la agitación, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante que contenía la proteína total y se determinó la concentración de proteína.

VII.7. Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford.⁹⁰ En el Cuadro 1 se muestra el proceso utilizado en la realización de las mezclas para determinar y cuantificar la proteína, el tubo número 1 fue el blanco y los tubos 2 al 6 corresponden a la curva patrón con albúmina, del tubo 7 en adelante (dependiendo del número de muestras) corresponde a las muestras problema. La determinación se llevó a cabo midiendo la absorbencia a 590nm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometere Plus).

Cuadro 1. Reactivos utilizados para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford.

Tubo	Albumina (1 mg/ml)	Muestra	Reactivo de Bradford	Buffer de lisis
1	0.0 μ l	-----	1 ml	1.0 μ l
2	2.5 μ l	-----	1 ml	1.0 μ l
3	5.0 μ l	-----	1 ml	1.0 μ l
4	10.0 μ l	-----	1 ml	1.0 μ l
5	15.0 μ l	-----	1 ml	1.0 μ l
6	20.0 μ l	-----	1 ml	1.0 μ l
7	-----	1.0 μ l	1 ml	-----

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado

VII.8. Determinación de Óxido Nítrico.

La cuantificación del óxido nítrico se realizó utilizando una alícuota de los sobrenadantes extraídos para la cuantificación de proteínas, una parte de ese sobrenadante se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 22mm (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Cork Ireland). La determinación se llevó a cabo por espectrofotometría en la región UV (490nm), a temperatura ambiente, utilizando un espectrofotómetro DW2000 (SLM-Aminco, SLM Instruments Inc., Urbana Illinois, USA)

VII.9. Separación de proteínas por electroforesis.

Las proteínas se separaron por electroforesis desnaturizante de acuerdo al método de Laemmli.⁹¹ Dependiendo el peso molecular de la proteína a separar fue el gel separador que se preparó, al 15 % para Rho, al 12 % para AT1, AT2, PPAR γ y al 8 % para eNOS y TRPV1; y un gel concentrador al 4% en todos los casos. Se cargaron 50 μ g de proteína total mezclada con un buffer de carga 3X (30% glicerol, 1.6% SDS, 3% azul de bromo fenol, 5% 2-mercaptoetanol, 125mM Tris, pH 6.8). La mezcla se calentó a 100°C, 5 min. Se cargó cada muestra en un carril del gel y se

incluyó en un carril 3 μ l de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Standards, BioRad). Se le aplicó un voltaje de 40mV durante 15 minutos, para asegurar que las muestras llegaran al gel separador al mismo tiempo, y después se aumentó el voltaje a 100mV durante 2.5 horas aproximadamente.

VII.10. Transferencia de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF, por el método de Towbin.⁹² Se llevó a cabo utilizando una cámara húmeda (BIO-RAD), a 4°C y a 500mA durante 1.5 horas, para eNOS y TRPV1, 1 hora para AT1, AT2, PPAR γ y Rho, con agitación constante. La membrana de PVDF se activó utilizando metanol al 100%, y se colocó sobre el gel de acrilamida.

VII.11. Bloqueo de la membrana de PVDF.

Al finalizar la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente y se volvió a humedecer con metanol al 100 %, para fijar aún más las proteínas a la membrana. Después se incubó la membrana con una solución de leche (Svelty bajo en grasa, Nestlé) al 5 % disuelta en buffer TBS - Tween20 al 0.1 %. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C.

VII.12. Determinación de proteínas por Western Blot.

La identificación de las proteínas se realizó mediante inmunodetección. La membrana de PVDF se incubó con un anticuerpo primario en una solución de TBS-Tween-20 0.1%, toda la noche, a 4°C. Al final de la incubación, el anticuerpo primario se recuperó y la membrana se lavó cuatro veces durante 10 minutos, con

una solución de TBS-Tween 0.1 %. Posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario unido a HRP, disuelto en una solución de TBS-Tween 0.1 %. La incubación con el anticuerpo secundario, se llevó a cabo durante toda la noche. Al término, el anticuerpo secundario se eliminó y la membrana se lavó cuatro veces por 10 minutos, con una solución de TBS-Tween 0.1 %. En el Cuadro 2 muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, su origen y concentración; dichas concentraciones fueron preparadas de acuerdo a lo reportado en la literatura y probadas en el laboratorio para lograr una óptima respuesta.

Cuadro 2. Anticuerpos utilizados durante cada experimento.

Anticuerpo	Dilución	Origen	Marca
Rho	1:2000	Rabbit	Millipore
NOS3	1:500	Mouse	Santa Cruz
TRPV1	1:1000	Rabbit	Santa Cruz
AT1	1:200	Rabbit	Santa Cruz
AT2	1:200	Rabbit	Santa Cruz
PPAR γ	1:500	Rabbit	Santa Cruz
GAPDH	1:1000	Mouse	Santa Cruz
HRP-Rabbit	1:10000	Rabbit	Jackson
HRP-Goat	1:10000	Goat	Jackson
HRP-Mouse	1:10000	Rabbit	Santa Cruz

VII.13. Detección de anticuerpos por Inmunoquimioluminiscencia.

La detección de los anticuerpos unidos a las proteínas de interés, se realizó mediante el uso de un kit de quimioluminiscencia Clarity Western ECL Substrate (BioRad Inc., USA). La luminiscencia emitida fue captada mediante la exposición y el revelado de una placa de rayos X en un cuarto oscuro.

VII.14. Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media \pm su error estándar. Y la comparación entre grupos de los diferentes tratamientos se realizó por análisis de varianza una sola vía (ANOVA), utilizando el programa Sigma Plot 11 (Jandel Scientific). Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS.

VIII.1. Determinación de la presión arterial de ratas normo e hipertensas.

Se observó que hubo una disminución significativa de la presión en el grupo hipertenso tratado con capsaicina comparado con las ratas hipertensas sin tratamiento de capsaicina (165 ± 4 mmHg vs 147 ± 2 mmHg), Cuadro 3. Al administrar capsacepina al grupo hipertenso se observó un aumento en la presión de 12mmHg.

Cuadro 3. Efectos de la capsaicina y capsacepina en la presión arterial media de ratas hipertensas y normotensas.

Tratamiento	Normotensas	Hipertensas
Control	118 ± 3	$165 \pm 4^*$
Capsaicina	121 ± 2	$147 \pm 2^{**}$
Capsacepina	130 ± 5	172 ± 3
Capsacepina + Capsaicina	125 ± 8	154 ± 9

N= 4

* $p < 0.05$. Normotensas vs Hipertensas ANOVA.

** $p < 0.05$ Hipertensas vs Hipertensas + Capsaicina ANOVA.

VIII.2. Determinación de Óxido Nítrico en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó que en las ratas hipertensas los niveles óxido nítrico son significativamente menores con respecto a las ratas normotensas normotensas. Se observó un aumento significativo en la producción de óxido nítrico (NO) en presencia de capsaicina, tanto en los grupos de ratas normotensas como hipertensas, ambos comparados con su propio control. Cuando se administró capsacepina en ambos grupos, se observó la disminución en la producción de óxido nítrico, con respecto al tratamiento con capsaicina. En ambos grupos de ratas, la producción de óxido nítrico es semejante, sin embargo se observó que los niveles de NO son mayores en todos los grupos normotensos con respecto a todos los grupos hipertensos.

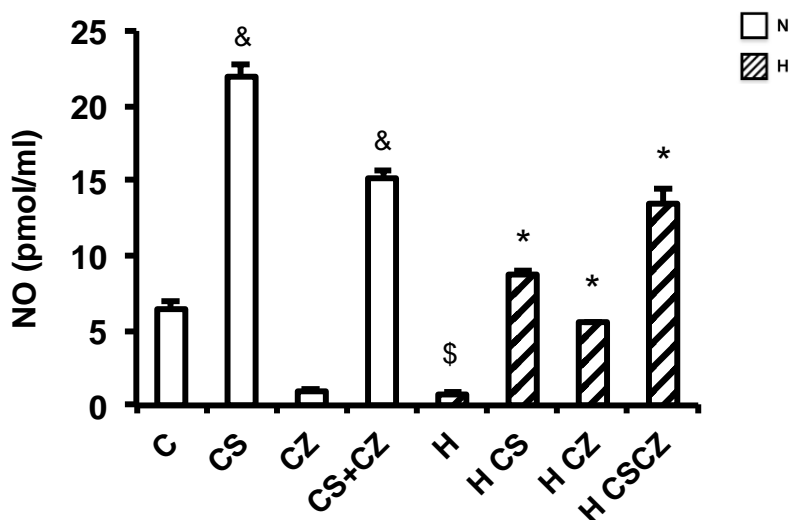


Figura 18. Niveles de óxido nítrico en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; CS, normotenso + capsaicina; CZ, normotenso + capsacepina (CZ viene del inglés capsazepine); CS+CZ, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; HCS, Hipertenso + capsaicina; HCZ, Hipertenso + capsacepina; HCS+CZ, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. & $p < 0.05$ C vs CS y C vs Cs+Cz Análisis Student Neuman, ANOVA. \$ $p < 0.05$ C Vs H Análisis Student Neuman, ANOVA; * $p < 0.05$ H vs HCS, H vs HCZ, H vs HCSCZ, Análisis Student Neuman, ANOVA.

VIII.3. Expresión de la enzima Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó una disminución significativa en la expresión de eNOS en las ratas normotensas tratadas con capsaicina comparadas con el control. Lo cual no se observa en las ratas hipertensas tratadas con capsaicina. También se observó un aumento en la expresión de la enzima en las ratas normotensas tratadas con capsacepina. En las ratas hipertensas no hubo cambio significativo. Como se observa en la Figura 19.

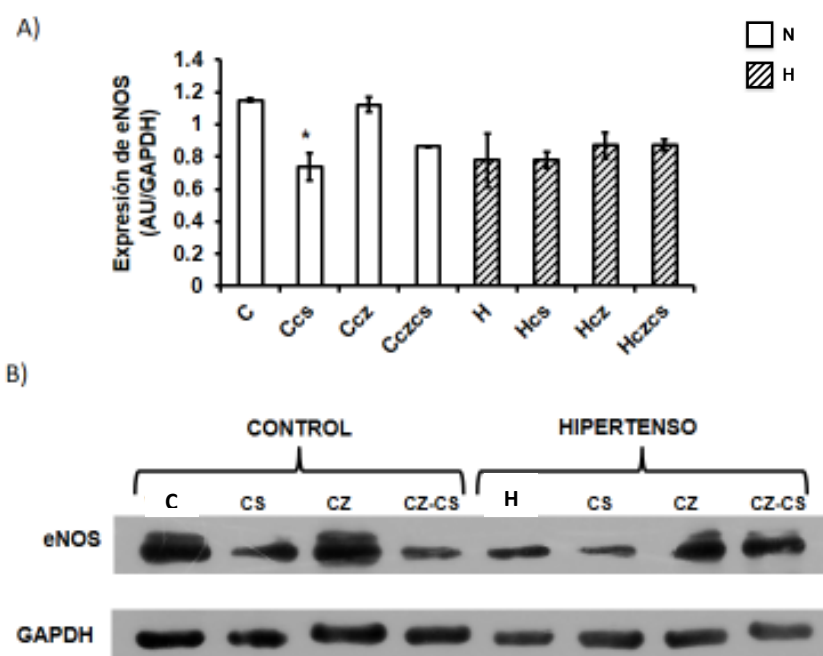


Figura19. Determinación de la expresión de la enzima eNOS en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; Ccs, normotenso + capsaicina; Ccz, normotenso + capsacepina (cz viene del inglés capsazepine); Cczcs, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; Hcs, Hipertenso + capsaicina; Hcz, Hipertenso + capsacepina; Hczcs, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. * $p < 0.05$ C vs Ccs Análisis Student Neuman, ANOVA En la figura A se muestran los datos expresados como la media \pm error estándar. En la figura B se muestra El análisis por densitometría de la enzima eNOS, las bandas corresponden al peso molecular de eNOS (140KDa) y al de la proteína control GAPDH con un peso molecular de (35 KDa).

VIII.4. Expresión del receptor TRPV1 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó que la expresión del receptor TRPV1 disminuye significativamente en las ratas hipertensas con respecto al grupo control normotenso tal como se muestra en la Figura 20. También se observó que las ratas control normotensas tratadas con capsacepina y con la mezcla de ambos compuestos mostraron una disminución significativa en la expresión del TRPV1, al compararlos con el grupo control normotenso. En el caso de los grupos hipertensos, se observó que existe diferencia al comparar el grupo control hipertenso contra el grupo hipertenso que fue tratado con capsaicina.

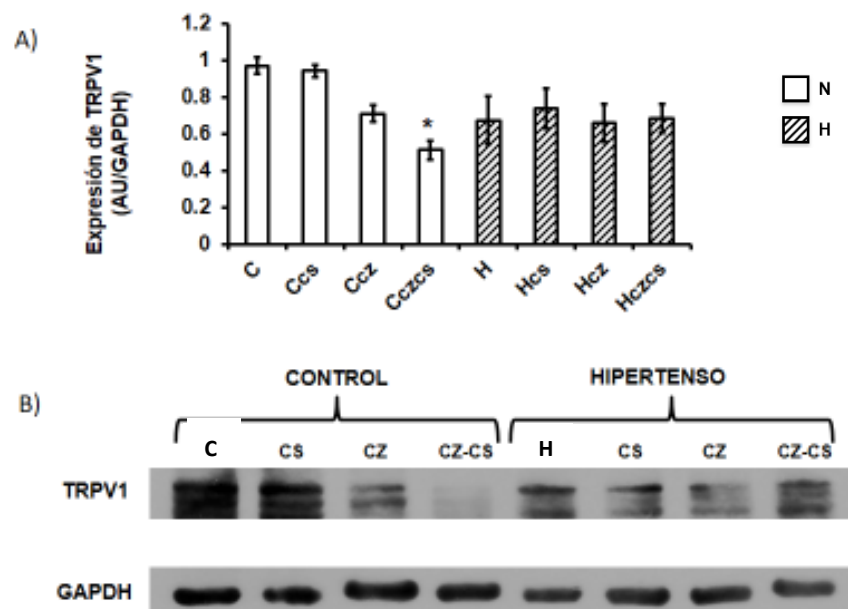


Figura 20. Determinación de la expresión del receptor TRPV1 en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; Ccs, normotenso + capsaicina; Ccz, normotenso + capsacepina (cz viene del inglés capsazepine); Cczcs, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; Hcs, Hipertenso + capsaicina; Hcz, Hipertenso + capsacepina; Hczcs, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. * $p < 0.05$ C vs Cczcs, Análisis Student Neuman, ANOVA. En la figura A se muestran los datos expresados como la media \pm error estándar. El análisis por densitometría del receptor TRPV1 se muestra en la figura B, las bandas corresponden al peso molecular del receptor TRPV1 (100 kDa) y al de la proteína control GAPDH con un peso molecular de (35 kDa).

VIII.5. Expresión del receptor AT1 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó que la expresión del receptor AT1 disminuye en el grupo hipertenso con respecto al grupo control normotenso, así como en los grupos control e hipertenso que fueron tratados con la mezcla de ambos compuestos (Figura 21). En el grupo hipertenso tratado con capsaicina aumentó la expresión del receptor AT1 al compararlo contra el grupo hipertenso sin tratamiento, se observó que para el grupo hipertenso tratado con capsacepina aumenta la expresión del receptor en el tejido cardiaco.

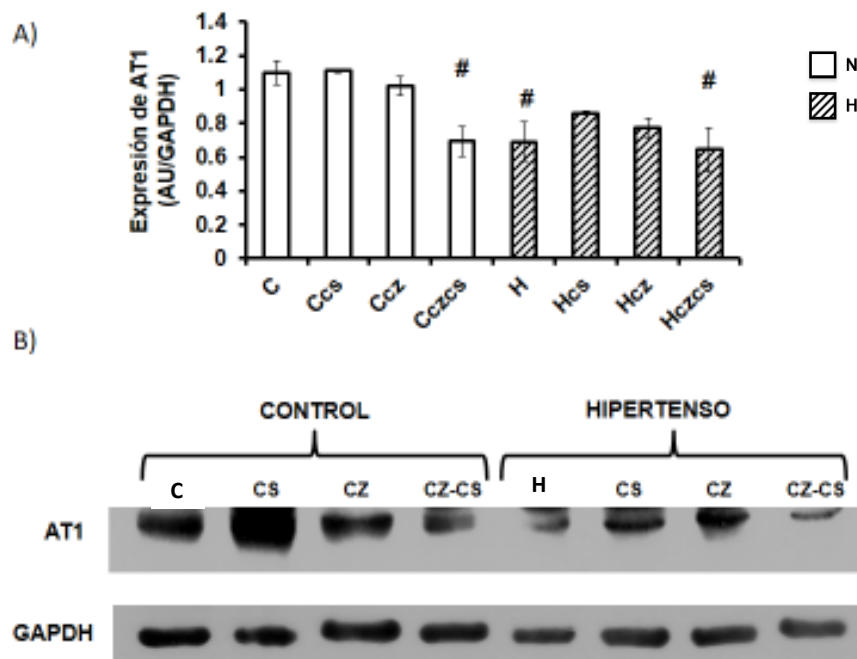


Figura 21. Determinación de la expresión del receptor AT1 en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; Ccs, normotenso + capsaicina; Ccz, normotenso + capsacepina (cz viene del inglés capsazepine); Cczcs, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; Hcs, Hipertenso + capsaicina; Hcz, Hipertenso + capsacepina; Hczcs, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. # p < 0.05 C vs Cczcs, C vs H, C vs Hczcs Análisis Student Neuman, ANOVA. En la figura A se muestran los datos expresados como la media \pm error estándar. El análisis por densitometría de AT1 se muestra en la figura B, las bandas corresponden al peso molecular de AT1 (43KDa) y al de la proteína control GAPDH con un peso molecular de (35 KDa).

VIII.6. Expresión del receptor AT2 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó que la expresión del receptor AT2 aumenta en todos los grupos hipertensos comparándolos contra todos los grupos controles normotensos y que su expresión es muy similar entre los grupos hipertenso e hipertenso tratado con capsaicina (Figura 22).

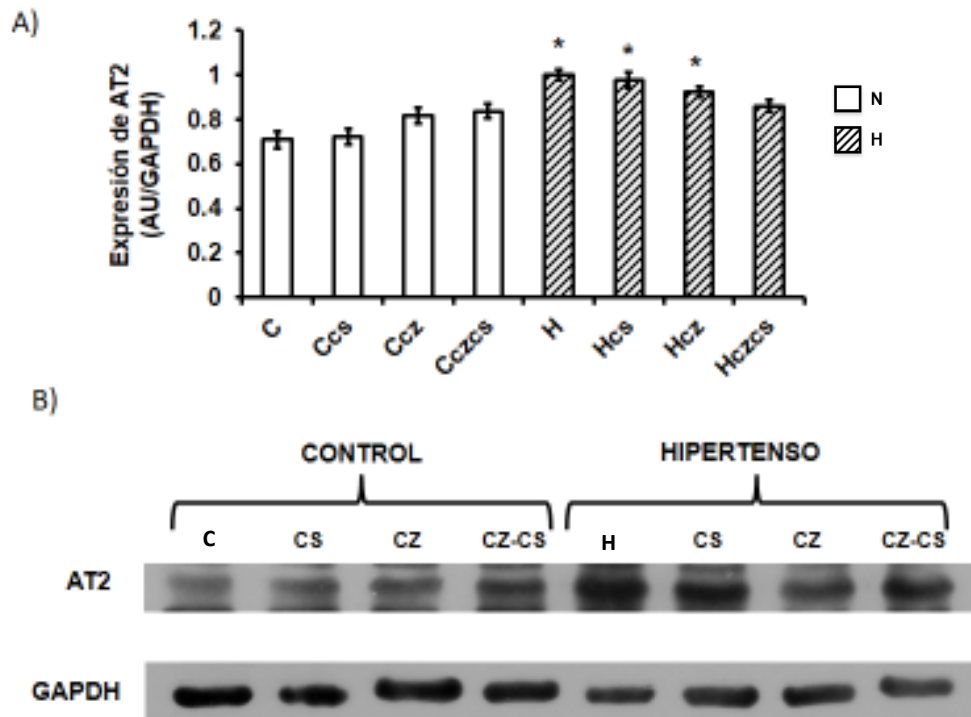


Figura 22. Determinación de la expresión del receptor AT2 en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; Ccs, normotenso + capsaicina; Ccz, normotenso + capsacepina (cz viene del inglés capsazepine); Cczcs, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; Hcs, Hipertenso + capsaicina; Hcz, Hipertenso + capsacepina; Hczcs, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. * $p < 0.05$ C vs H, C vs Hcs, C vs Hcz. Análisis Student Neuman, ANOVA En la figura A se muestran los datos expresados como la media \pm error estándar. El análisis por densitometría de AT2 se muestra en la figura B, las bandas corresponden al peso molecular de AT2 (41KDa) y al de la proteína control GAPDH con un peso molecular de (35 KDa).

VIII.7. Expresión de PPAR γ en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó que la expresión de PPAR γ disminuye en el grupo hipertenso con respecto al grupo normotenso, también se observó su disminución en los grupos normotenso tratado con capsaicina y tratado con ambos compuestos y en los grupos hipertensos tratados con capsaicina, con capsacepina y con la mezcla de ambos compuestos; en todos los casos comparados con el grupo control normotenso. También se observó una disminución en su expresión al comparar el grupo hipertenso tratado con capsacepina con el grupo normotenso tratado con el mismo compuesto (Figura 23).

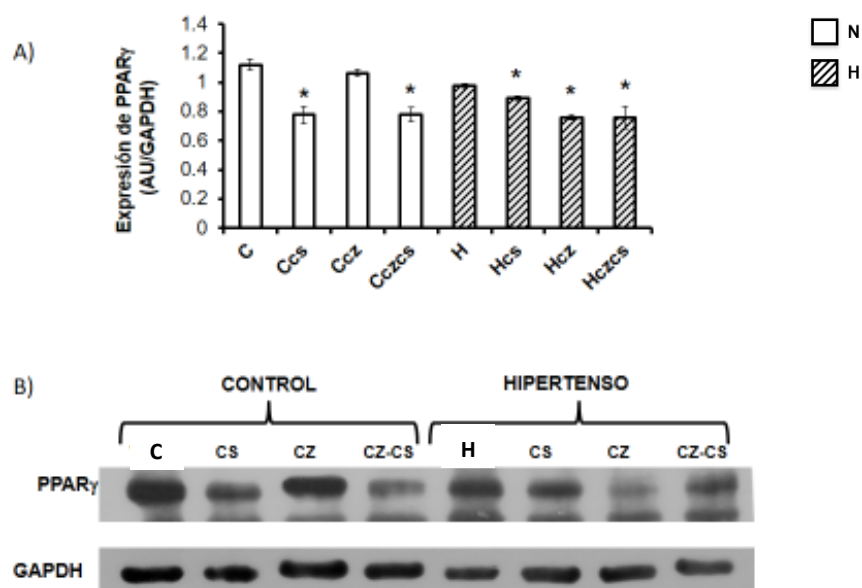


Figura 23. Determinación de la expresión de PPAR γ en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; Ccs, normotenso + capsaicina; Ccz, normotenso + capsacepina (cz viene del inglés capsazepine); Cczcs, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; Hcs, Hipertenso + capsaicina; Hcz, Hipertenso + capsacepina; Hczcs, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. * $p < 0.05$ C vs Ccs, C vs czcs, C vs Hcs, C vs Hcz, C vs Hczcs. Análisis Student Neuman, ANOVA En la figura A se muestran los datos expresados como la media \pm error estándar. El análisis por densitometría de PPAR γ se muestra en la figura B, las bandas corresponden al peso molecular de PPAR γ (50KDa) y al de la proteína control GAPDH con un peso molecular de (35 KDa).

VIII.8. Expresión de Rho en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina.

Se observó que existe un aumento en su expresión si se comparan los grupos normotenso con capsaicina e hipertenso con capsaicina. Su expresión disminuye comparado el grupo normotenso tratado con capsacepina con el grupo hipertenso con capsacepina y también disminuye si se comparan los grupos control con capsaicina y capsacepina e hipertenso con capsaicina y capsacepina (figura 24).

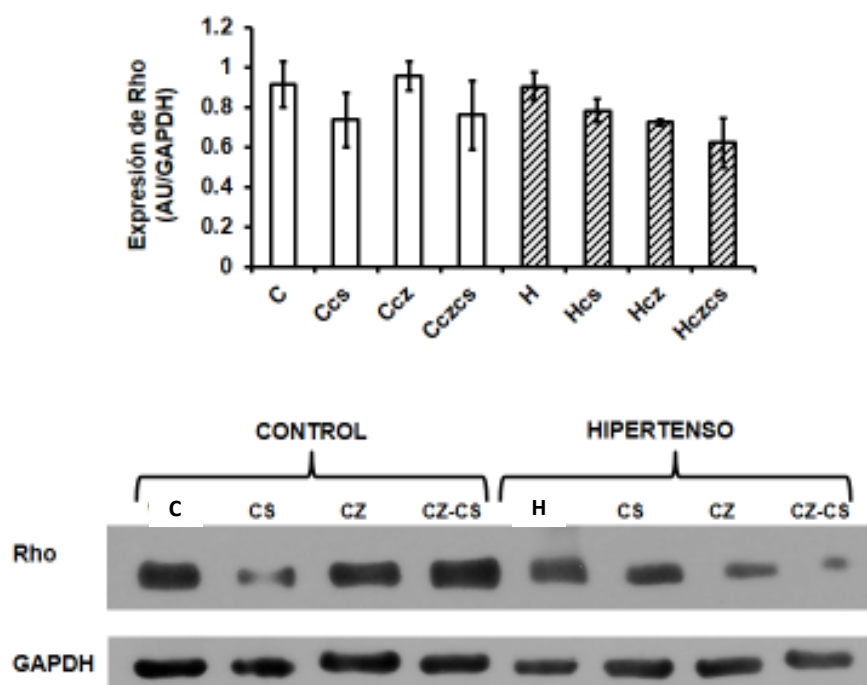


Figura 24. Determinación de la expresión de la GTPasa pequeña Rho en ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina. N, normotensas; H, hipertensas. C, control normotenso; Ccs, normotenso + capsaicina; Ccz, normotenso + capsacepina (cz viene del inglés capsazepine); Cczcs, normotenso + capsaicina + capsacepina; H, control hipertenso; Hcs, Hipertenso + capsaicina; Hcz, Hipertenso + capsacepina; Hczcs, Hipertenso + capsaicina + capsacepina. N= 4 para todos los grupos. En la figura A se muestran los datos expresados como la media \pm error estándar $p < 0.05$. Análisis Student Neuman, ANOVA. El comportamiento del gráfico es tendencia a no significancia. El análisis por densitometría de Rho se muestra en la figura B, las bandas corresponden al peso molecular de Rho (22KDa) y al de la proteína control GAPDH con un peso molecular de (35 KDa).

IX. DISCUSIÓN.

IX.1. Efecto de la capsaicina sobre la presión arterial y la síntesis de óxido nítrico en ratas normo e hipertensas.

La HTA es un padecimiento que actualmente afecta aproximadamente al 31% de la población en nuestro país, de tal manera que su atención y prevención la han convertido en una de las enfermedades con mayor importancia en el país y a nivel mundial. Distintos estudios se han realizado tratando de entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la HTA y de contrarrestar sus efectos en el organismo, debido principalmente a que la HTA promueve problemas mucho más graves como la enfermedad cerebrovascular y/o la falla renal. [Colín-Ramírez E y Cols. 2017](#)

Tratando de entender qué tipo de proteínas o moléculas pudieran estar involucradas con la regulación de la HTA, se utilizó un modelo de rata normotensa e hipertensa, a las que se les administró capsaicina como agonista y capsacepina como antagonista de un canal de la membrana plasmática celular conocido como TRPV1. En estas condiciones de tratamiento, se les determinó la presión arterial a todos los grupos experimentales, como se muestra en el Cuadro 3, donde se observó que en el grupo normotenso la presión fue de 118 ± 3 mmHg comparado con el grupo hipertenso, cuya presión fue mayor (165 ± 4 mmHg), y cuando se administraron los fármacos se observó una disminución de la presión en el grupo hipertenso en presencia de capsaicina (147 ± 2 mmHg) y un aumento de la presión en el grupo hipertenso tratado con capsacepina (172 ± 3 mmHg) por arriba de la lectura de presión del grupo control hipertenso, con lo que fue posible observar el efecto de regulación que presentó la capsaicina sobre la presión arterial.

También se determinaron los niveles de óxido nítrico un metabolito que funciona como un vasodilatador y ayuda a regular la presión sanguínea en el organismo, observándose un aumento significativo en los niveles de éste metabolito en ratas control e hipertensas en presencia de capsaicina, [Gardiner SM y Cols. 1990](#) y, como se observa en la Figura 18, la capsaicina participa también en la regulación de la presión arterial a través de la síntesis de óxido nítrico, lo cual implicaría que la actividad del TRPV1 esté regulando la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), al activarse éste canal, induciendo el transporte de Ca^{++} el cual funciona como segundo mensajero para algunas vías de señalización, como por ejemplo para enzimas como es la Protein cinasa A (PKA), que se encarga de fosforilar a la NOS endotelial, aumentando su actividad y aumentando la producción de óxido nítrico. [Randhawa PK and Cols. 2017](#)

IX.2 Determinación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial y expresión del receptor TRPV1.

Como se mencionó la presencia de la capsaicina, induce un aumento en los niveles de óxido nítrico y una disminución en la presión arterial en el modelo de rata hipertensa, esto quiere decir que muy probablemente, el receptor TRPV1 y la eNOS presentarán un aumento en su expresión en presencia de capsaicina. Relacionando de esta manera la actividad del canal y la regulación de cascadas de señalización intracelular que involucran la activación o inhibición de diferentes enzimas reguladoras en la célula, tales como las que se encargan de modular la presión arterial.

Pero cuando se determinaron los niveles de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial, se observó una disminución en los niveles de expresión de ésta proteína

con respecto al control en ratas normotensas, y en las ratas hipertensas no se observó diferencia, su expresión se mantuvo constante en ausencia y en presencia de capsaicina como se observa en la Figura 19. Lo cual implicaría que la capsaicina podría estar favoreciendo la actividad enzimática de la eNOS, a través de un mecanismo de segundos mensajeros, ya que al inducir la entrada de calcio por el receptor TRPV1, se induciría la fosforilación de la eNOS aumentando de esta manera la producción de óxido nítrico en la célula, como ya se había observado.

[McCarty MF y Cols. 2015.](#)

Por otro lado, cuando se determinó la expresión del receptor TRPV1, lo que se observó fue la tendencia a aumentar su expresión en presencia de capsaicina en las ratas hipertensas sin observarse diferencias en las ratas normotensas, aunque si comparamos ambos modelos la expresión del TRPV1 disminuyó en el grupo hipertenso con respecto al grupo control normotenso como se observa en la Figura 20, éste efecto sobre la expresión del TRPV1 en ratas hipertensas tratadas con capsaicina, implicaría la participación del receptor activado por capsaicina en la regulación de la presión arterial, a través de cascadas de señalización que involucran la regulación de enzimas como la óxido nítrico sintasa endotelial, quien es regulada por procesos de fosforilación y defosforilación que muy probablemente estén siendo inducidos por la presencia de la capsaicina y el receptor TRPV1. [McCarty MF y Cols. 2015.](#) El aumento en la expresión del receptor en las ratas hipertensas tratadas con capsaicina va de la mano con la disminución de la presión arterial de acuerdo a los resultados discutidos con anterioridad. Por otro lado, se observó que en el tratamiento con capsacepina, disminuye la expresión del receptor en las ratas hipertensas y normotensas, lo cual implica que efectivamente la capsaicina es un

agonista importante e involucrado con la regulación de la presión arterial a través del receptor TRPV1.

IX.3. Expresión de los receptores de angiotensina AT1 y AT2 en ventrículo izquierdo de ratas normo e hipertensas tratadas con capsaicina y capsacepina y la relación con las proteínas Rho y PARRY.

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (RAS), es uno de los mecanismos que regulan la homeóstasis en el organismo, en un inicio se describió específicamente en el riñón, sin embargo, éste también ha sido detectado en sitios como el endotelio vascular, lo cual implica que éste sistema tiene un papel muy importante en la regulación de la presión arterial en todo el organismo a través de diferentes sitios de acción. Al ser un sistema de mucha importancia decidimos también analizar cuál era el comportamiento de algunas de las proteínas involucradas con RAS, en los modelos de rata que estuvimos manejando, como se observa en los resultados analizamos la expresión de dos proteínas importantes en el sistema renina angiotensina, los receptores a Angiotensina tipo 1 y 2. Y como se observa en la Figura 21 y 22, hay una disminución en la expresión del receptor AT1 al comparar el grupo control normotenso e hipertenso, y cuando se les administró capsaicina se observó un pequeño aumento en la expresión del receptor en ratas hipertensas, mientras que el receptor AT2 aumenta su expresión en el grupo de ratas hipertensas comparadas con las normotensas.

Bien se sabe que la expresión y actividad del receptor AT1 promueve el aumento en la presión arterial debido, principalmente, a que promueven la vasoconstricción por el aumento de radicales libres generados por enzimas como la NADPH oxidasa en el endotelio celular ^{Kawai T y Cols. 2017} desencadenando HTA y disfunción endotelial,

en nuestros resultados observamos que los niveles de este receptor aumentaron en presencia de capsaicina en las ratas hipertensas, mientras que la expresión del receptor AT2 permaneció prácticamente sin cambios en el mismo grupo. Al encontrarse mayor expresión del receptor AT2 en comparación con la expresión del receptor AT1 para el grupo de ratas hipertensas tratadas con capsaicina sugerimos que el receptor AT2 antagoniza los efectos del receptor AT1 y además trabaja en conjunto con la síntesis de NO para generar un valor normal de presión arterial ya que la activación del receptor AT2 causa relajación a través de la activación de Protein Cinasas dependientes de la actividad de la eNOS o dependientes de óxido nítrico. Lo cual explicaría muy bien el efecto que se observa sobre la disminución de la presión arterial en las ratas hipertensas tratadas con capsaicina. Kawai T y Cols.

²⁰¹⁷ Involucrando también al receptor TRPV1 que es quien ésta siendo directamente regulado por la capsaicina y probablemente esté ejerciendo un efecto sinérgico junto con sistemas como RAS para la regulación de la HTA en éste modelo de ratas.

Relacionado también con los receptores a angiotensina, se encuentra el regulador traduccional PPAR γ , quien está muy involucrado con la actividad del sistema renina angiotensina y la regulación de la presión arterial en el organismo, debido a que participa también en el remodelado vascular y la disfunción endotelial. De acuerdo a los resultados observados, la expresión de PPAR γ disminuyó en los grupos tratados con capsaicina, tal como se muestra en la Figura 23, tanto en las ratas normotensas como en las hipertensas, sugiriendo que la capsaicina también participa en la regulación de la expresión de este factor de transcripción a través de la activación del receptor TRPV1 y los efectos de transeñalización que se desencadenan con la actividad del TRPV1. Kawai T y Cols. 2017

De hecho los receptores de angiotensina también son capaces de regular proteínas como las GTPasas pequeñas, una familia de proteínas encargada también de regular la actividad y expresión de otras proteínas en la célula, como por ejemplo los reguladores de la transcripción como PPAR γ . Rho es un miembro de la superfamilia de GTPasas y al activarse Rho, se ha visto que desencadena señales que involucran la contracción del endotelio, y como se observó en nuestros resultados ésta GTPasa pequeña disminuye en presencia de capsaicina, tanto en ratas normotensas como hipertensas como se observa en la Figura 24, lo cual va de acuerdo al proceso de relajación del endotelio y disminución de la presión arterial, eso significaría que la expresión de esta proteína también pudiera estar siendo regulada por la capsaicina, aunque aquí tenemos que llevar a cabo más experimentos porque la activación de esta GTPasa depende de derivados de colesterol que son sintetizados en el citoplasma celular. De acuerdo a la literatura, ésta inhibición de la vía Rho/Rock podría ser explicada por el propio mecanismo de activación del receptor TRPV1 y que además están involucrados los canales de Potasio que son sensibilizados dentro de la misma activación del receptor TRPV1.

Zhu ZY1 y Cols. 2011.

X. CONCLUSIONES

- El tratamiento con capsaicina a ratas hipertensas disminuye la presión arterial.
- La activación del receptor TRPV1 aumenta la síntesis de óxido nítrico en el tejido cardiaco.
- La capsaicina disminuye la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) en las ratas normotensas.
- La capsacepina bloquea al receptor TRPV1 en el corazón, dejando ver que su papel como antagonista del mismo funciona también a nivel cardiaco.
- En presencia de capsaicina el receptor TRPV1 tiende a aumentar su expresión en el corazón de las ratas hipertensas.
- En el sistema renina angiotensina cardiaco, la expresión del receptor AT1 aumenta en presencia de capsaicina en las ratas hipertensas, mientras que la expresión del receptor AT2 permanece sin cambios.
- Del mismo modo proteínas reguladoras de la expresión y actividad del sistema renina angiotensina como son PPAR γ y la GTPasa pequeña Rho también son reguladas por el agonista del receptor TRPV1 en el corazón.
- En resumen, la capsaicina es una molécula que está participando en la regulación de la presión arterial en el corazón a través de diferentes mecanismos de acción.

XI. PERSPECTIVAS.

- Determinar la participación del receptor MAS en el Sistema Renina Angiotensina, ya que es un receptor que funciona como vía alterna a la activación de los receptores AT1 y AT2, a través de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ECA2) y su producto de síntesis, la Angiotensina 1-7 y su comportamiento en presencia de capsaicina y capsacepina.
- Determinar la vía a través de la cual la capsaicina regula proteínas como Rho y PPAR γ en las células cardíacas.
- Determinar la participación de la vía Akt en la activación de Rho así como en la fosforilación de la enzima eNOS, ya que es una vía alterna de segundos mensajeros relacionada con la fosforilación de eNOS y la síntesis de NO, en las condiciones de estudio.
- Detectar y cuantificar los niveles de radicales libres con DCFH (diclorodihidrofluorescein, reactivo que mide especies reactivas de oxígeno a través de fluorescencia) en las condiciones de estudio.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Lewis O. Stephen Hales and the measurement of blood pressure. *J Hum Hypertens*. 1994 Dec;8(12):865-71.
- 2.- Brown WC1, O'Brien ET, Semple PF. J The sphygmomanometer of Riva-Rocci 1896-1996. *Hum Hypertens*. 1996 Nov;10(11):723-4.
- 3.- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016), Instituto Nacional de Salud Pública, Octubre de 2016.
- 4.- Emelia J. Benjamin, Michael J. Blaha, Stephanie E. Chiuve, Mary Cushman, Sandeep R. Das, Rajat Deo, et. al., On behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017 March 07; 135(10): e146–e603.
- 5.- Rehman S, Nelson VL. Blood Pressure Measurement. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-.2018 Jan 8
- 6.- OMS. Informe Sobre La Situación Mundial de las enfermedades no transmisibles 2014. Available en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149296/1/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf?ua=1&ua=1
- 7.- Morales-Ruán MDC1, Shamah-Levy T2, Mundo-Rosas V1, Cuevas-Nasu L1, Lozada-Tequeanes AL1, Romero-Martínez M1. Evolution of social food assistance programs in Mexico through Ensanut MC 2016 data. *Salud Publica Mex*. 2018 May-

Jun;60(3):319-327. doi: 10.21149/8818.

8.- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et. al. ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 2007 Sep;25(9):1751-62.

9.- Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Villalpando S, Rodríguez-Gilbert C, Durazo-Arvizu R, Aguilar-Salinas CA. Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex* 2010; 52 suppl 1:S63-S71.

10.- Kearney P, Whelton M, Reynolds P, Whelton H, Jiang H. Worldwide prevalence of hypertension. *Journal of Hypertension* 2004, 22:11–19

11.- Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, Whelton PK. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 22;4:18014. doi: 10.1038/nrdp.2018.14.

12.- Bakris GL. The importance of blood pressure control in the patient with diabetes. *Am J Med* 2004; 116: 30S-38S.

13.- The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003; 42: 1206 – 1252.

14.- Dong X.P, Wang X, Xu H. TRP channels of intracellular membranes. *Journal of*

Neurochemistry. 2010;113(2):313–328.

15.- Ramsey I.S, Delling M, Clapham D.E. An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology*. 2006;68:619–647.

16.- Li H (2017) TRP channel classification. *Adv Exp Med Biol* 976:1–8.

17.- Moran M.M, Xu H, Clapham D.E. TRP ion channels in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*. 2004;14(3):362–369.

18.- Samie M, Xu H. Studying TRP Channels in Intracellular Membranes. In: Zhu MX1, editor. *SourceTRP Channels*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 19.

19.- Planells CR, Ferrer MA. Drug design and development through the vanilloid receptor. *Exp. Opin. Drug. Discov*. 2007;2: 1053-1063.

20.- Nobuaki Takahashi, Daisuke Kozai, and Yasuo Mori. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. 2012; 3: 324.

21.- Caterina MJ, Julius DD. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001;24: 487-517.

22.- Adamian L, Liang J. Prediction of transmembrane helix orientation in polytopic membrane proteins. *BMC Structural Biology*. 2006; 6:13.

23.- Cheng W, Yang F, Takanishi CL, Zheng J. Thermosensitive TRPV Channel Subunits Coassemble into Heteromeric Channels with Intermediate Conductance and Gating Properties. *The Journal of General Physiology*. 2007; 129:191–207.

24.- Chung MK, Guler AD, Caterina MJ. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci.* 2008; 11:555–564; Yang F, Cui Y, Wang K, Zheng J. Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *P Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:7083–7088.

25.- Phelps C, Procko E, Lishko P, Wang R, Gaudet R. Insights into the roles of conserved and divergent residues in the ankyrin repeats of TRPV channels. *Channels.* 2007; 1:148–151.

26.- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R. A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels. *J Neurosci.* 2006; 26:4835–4840.

27.- Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 2009; 42:201–246; Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A. Identification of a Tetramerization Domain in the C Terminus of the Vanilloid Receptor. *J Neurosci.* 2004; 24:5307–5314.

28.- Amrita Samanta, Taylor E. T. Hughes and Vera Y. Moiseenkova-Bell. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem.* 2018 ; 87: 141–165.

29.- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389(6653):816–824.

30.- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. TRPV3 is a temperature- sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*. 2002; 418(6894):186–190.

31.- Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature*. 2016; 534(7607):347–351.

32.- Edwards JG. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog Drug Res*. (2014) 68:77– 104.

33.- Eid SR, Cortright DN. (2009). Transient receptor potential channels on sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*. 194:261–81.

34.- Bielefeldt K, Davis BM. Differential effects of ASIC3 and TRPV1 deletion on gastroesophageal sensation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. (2008) 294:G130–8.

35.- Zhang LL, Yan Liu D, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res*. (2007) 100:1063–70.).

36.- Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. 2013 Dec 5; 504(7478):113-8.

37.- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* (2013) 504:107–12.

- 38.- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* (2013) 504:107–12.
- 39.- Okumura Y, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, et al. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2010) 74:1068–72.
- 40.- Cromer BA, McIntyre P. Painful toxins acting at TRPV1. *Toxicon* (2008) 51:163–73.
- 41.- Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem.* (2004) 271:1827–34.
- 42.- Christie S, Wittert GA, Li H and Page AJ (2018) Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* 9:420.
- 43.- Vigna SR, Shahid RA, Nathan JD, Mcvey DC, Liddle RA. Leukotriene B4 mediates inflammation via TRPV1 in duct obstruction-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* (2001) 40:708–14.
- 44.- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* 2006; 26: 4835-40.
- 45.- Wang Y, Cui L, Xu H, Liu S, Zhu F, Yan F, Shen S, Zhu M. TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of eNOS/NO pathway.

Atherosclerosis. 2017 May;260:13-19. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.016.

Epub 2017 Mar 10.

46.- Yu SQ, Ma S, Wang DH. Activation of TRPV1 Prevents Salt-Induced Kidney Damage and Hypertension After Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats.

Kidney Blood Press Res. 2018;43(4):1285-1296. doi: 10.1159/000492412. Epub

2018 Aug 3.

47.- Li X, Hou J, Du J, Feng J, Yang Y, Shen Y, Chen S, Feng J, Yang D, Li, Pei H, Yang Y. . Potential Protective Mechanism in the Cardiac Microvascular Injury.

Hypertension. 2018 Jul;72(1):116-127. doi:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11035. Epub 2018 May 7

48.- [Randhawa PK](#), [Jaggi AS](#). TRPV1 channels in cardiovascular system:

A double edged sword?. [Int J Cardiol](#). 2017 Feb 1;228:103-113. doi:

10.1016/j.ijcard.2016.11.205. Epub 2016 Nov 9.

49.-Thresh, J.C. Capsaicin, the active principle of capsicum fruits. Pharm. J. Trans. 1876, 7, 259–260.

50.- Nelson, E.K. The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. J. Am. Chem. Soc. 1919, 41,1115–1121.

51.- , Späth, E.; Darling, S.F. Synthese des capsaicins. Eur. J. Inorg. Chem. 1930, 63, 737–743.

- 52.- Zahra, N.; Alim-un-Nisa, I.K.; Hina, S.; Javed, A.; Inam, S.M.; Malik, S.M.; Arshad, F. Estimation of capsaicin in different chilli varieties using different extraction techniques and HPLC method: A review. *Pak. J. Food Sci.* 2016, 26, 54–60.
- 53.- Sunil K. Panchal, Edward Bliss and Lindsay Brown. Capsaicin in Metabolic Syndrome. *Nutrients* 2018, 10, 630.
- 54.- Frias, B.; Merighi, A. Capsaicin, nociception and pain. *Molecules* 2016, 21, 797.
- 55.- Basith, S.; Cui, M.; Hong, S.; Choi, S. Harnessing the therapeutic potential of capsaicin and its analogues in pain and other diseases. *Molecules* 2016, 21, 966.
- 56.- SZALLASI, A. (2002). Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 118, 110–121.
- 57.- Ruth A. Ross. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology* (2003) 140, 790–801.
- 58.- HWANG, S.W., HAWOON, C., KWAK, J., LEE, S.-Y., KANG, C.-J., JUNG, J., CHO, S., MIN, K.H., SUH, Y.-G., KIM, G. & OH, U. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenase: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 6155–6160.
- 59.- AHLUWALIA, J., YAQOUB, M., URBAN, L., BEVAN, S. & NAGY, I. (2003). Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release. *J. Neurochem.*, 84, 585 – 591.

- 60.- Justyna Olszewska and Eugenia Tęgowska. Opposite effect of capsaicin and capsaizepine on behavioral thermoregulation in insects. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2011 Oct; 197(10): 1021–1026.
- 61.- S. Iravanian, S.C. Dudley, The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm*. 5 (2008).2008.02.025 (S12-7).
- 62.- K.E. Bernstein, R.A. Gonzalez-Villalobos, J.F. Giani, K. Shah, E. Bernstein, T. Janjulia, Y. Koronyo, P.D. Shi, M. Koronyo-Hamaoui, S. Fuchs, X.Z. Shen, Angiotensin-converting enzyme overexpression in myelocytes enhances the immune response, *Biol. Chem*. 395 (2014) 1173–1178.
- 63.- Garland SL. Are GPCRs still a source of new targets? *J Biomol Screen*. 2013; 18(9):947–66.
- 64.- Bryna S.M. Chow, Terri J. Allen. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. *Clinical Science*. Jun 29, 2016, 130 (15) 1307-1326.
- 65 .- Khan BV. The effect of amlodipine besylate, losartan potassium, olmesartan medoxomil, and other antihypertensives on central aortic blood pressure and biomarkers of vascular function. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2011; 5(5):241–73.
- 66.- Takanobu Takezako, Hamiyet Unal, Sadashiva S Karnik, and Koichi Node. Current Topics in Angiotensin II Type 1 Receptor Research: Focus on Inverse Agonism, Receptor Dimerization and Biased Agonism. *Pharmacol Res*. 2017 September ; 123: 40–50.

- 67.- Elena Kaschina, Pawel Namsolleck, Thomas Unger. AT₂ receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Research*. 125 (2017) 39–47.
- 68.- Y. Nio, H. Matsubara, S. Murasawa, M. Kanasaki, M. Inada, Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 46–54.
- 69.- P. Namsolleck, C. Recarti, S. Foulquier, U.M. Steckelings, T. Unger, AT₂ receptor and tissue injury: therapeutic implications, *Curr. Hypertens. Rep.* 16 (2014) 416.
- 70.- Tianxin Yang and Chuanming Xu. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *J Am Soc.* 2017, 28: 1040–1049.
- 71.- Dzau VJ: Evolving concepts of the renin- angiotensin system. Focus on renal and vascular mechanisms. *Am J Hypertens* 1: 334S–337S, 1988.
- 72.- S. Iravanian, S.C. Dudley, The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and cardiac arrhythmias, *Heart Rhythm.* 5 (2008).
- 73.- M. KVANDOVÁ, M. MAJZÚNOVÁ, I. DOVINOVÁ. The Role of PPAR_γ in Cardiovascular Diseases. *Physiol. Res.* 65 (Suppl. 3): S343-S363, 2016.
- 74.- Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 2001;56: 239–263.

75.- Boitier E, Gautier JC, Roberts R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol* 2003;2:3.

76.- Schařer HL, Linz W, Falk E, Glien M, Glombik H, Korn M, Wendler W, Herling AW, Ruřten HAV. E8134, a novel potent PPARalpha agonist, improves lipid profile and glucose metabolism in dyslipidemic mice and type 2 diabetic rats. *Acta Pharmacol* 2012;33:82–90.

77.- Bojic LA, Sawyez CG, Telford DE, Edwards JY, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits human macrophage foam cell formation and the inflammatory response induced by very low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2919–28.

78.- Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene – a review. *Diabetes Metab Syndr* 2015;9:46–50.

79.- Tsai YS, Xu L, Smithies O, Maeda N. Genetic variations in peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression affect blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19084–89.

80.- Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24:342-56.

81.- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Mae-kawa M, et al. Calcium sensitization of smooth muscle

mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389:990-4.

82.- Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003; 93:767-75.

83.- Ishimaru K, Ueno H, Kagitani S, Takabayashi D, Takata M, Inoue H. Fasudil attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of monocyte/macrophage infiltration in the heart of DOCA/salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50:187-94.

84.- [Agita A1](#), [Alsagaff MT](#) *Acta Med Indones.* Inflammation, Immunity, and Hypertension. 2017 Apr;49(2):158-165.

85.- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol.* 1996;10(3-4):291-316.

86.- Luscher TF y Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis.* 1995;118 Suppl:S81-90.

87.- de Aluja AS 2002 Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex* 138 (3): 295-298.

88.- Henrion D, Dowell FJ, Levy BI, Michel JB, 1996 In vitro alteration of aortic vascular reactivity in hypertension induced by chronic NG-Nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 28 (3):361-366.

89.- Sefton BM. Labeling cultured cells with $^{32}\text{P}_i$ and preparing cell lysates for immunoprecipitation. (2005). Unit 18.2. F. M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

90.- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. (1976), 72: 248-254.

91.- Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature. (August 1970), 227 (5259): 680–685.

92.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology. (1979), 24:145-9. 1979.

93.- [Colín-Ramírez E](#)¹, [Rivera-Mancía S](#)¹, [Infante-Vázquez O](#)², [Cartas-Rosado R](#)¹, [Vargas-Barrón J](#)³, [Madero M](#)⁴, [Vallejo](#) Protocol for a prospective longitudinal study of risk factors for hypertension incidence in a Mexico City population: the Tlalpan 2020 cohort. [M5BMJ Open](#). 2017 Jul 31; 7(7):e016773. doi: 10.1136/bmjopen-2017-016773.

94.- [Gardiner SM](#)¹, [Compton AM](#), [Bennett T](#), [Palmer RM](#), [Moncada S](#). Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. [Br J Pharmacol](#). 1990 Sep; 101(1):10-2.

- 95.- [Randhawa PK](#)¹, [Jaggi AS](#)². TRPV1 channels in cardiovascular system: A double edged sword? [Int J Cardiol.](#) 2017 Feb 1; 228:103-113. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.205. Epub 2016 Nov 9.
- 96.- [McCarty MF](#)¹, [DiNicolantonio JJ](#)², [O'Keefe JH](#)². Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health. [Open Heart.](#) 2015 Jun 17; 2(1):e000262. doi: 10.1136/openhrt-2015-000262. eCollection 2015.
- 97.- Kawai T¹, Forrester SJ¹, O'Brien S², Baggett A¹, Rizzo V¹, Eguchi S³. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res.* 2017 Nov; 125(Pt A):4-13. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.008. Epub 2017 May 17.
- 98.- Zhu ZY¹, Zhang LL, Wang PJ, Ma LQ, Wang LJ, Liu DY, Zhu ZM. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. [Activation of transient receptor potential vanilloid 1 inhibits RhoA/Rho kinase and improves vasorelaxation dysfunction mediated by high-fat diet in mice]. [Article in Chinese] 2011 Dec; 33(6):600-5.