



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DE COX-2 Y EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y SU RELACIÓN CON
ALTERACIONES MORFOFUNCIONALES EN EL RIÑÓN DE RATAS SHR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARMEN GUADALUPE MONDRAGÓN HUERTA

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

COMITÉ TUTOR: DRA MARIA DEL ROCÍO BAUTISTA PÉREZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHAVEZ
DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DE COX-2 Y EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y SU RELACIÓN CON
ALTERACIONES MORFOFUNCIONALES EN EL RIÑÓN DE RATAS SHR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARMEN GUADALUPE MONDRAGÓN HUERTA

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

COMITÉ TUTOR: DRA MARIA DEL ROCÍO BAUTISTA PÉREZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHAVEZ
DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2022.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/524/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de marzo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **MONDRAGÓN HUERTA CARMEN GUADALUPE** con número de cuenta **99513164** con la tesis titulada **“Evaluación de COX-2 y el sistema renina-angiotensina y su relación con alteraciones morfofuncionales en el riñón de ratas SHR.”**, realizada bajo la dirección del **DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
Vocal: DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
Vocal: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
Vocal: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de mayo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM el apoyo recibido para la realización de este proyecto de investigación y por la formación académica que me otorgaron.

Agradezco la beca otorgada por CONACyT (202693) y por el apoyo económico otorgado a proyecto de investigación por CONACyT (102022), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), (UNAM) (IN221615); el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA) (FES-Iztacala, UNAM) (FESI- DIP-PAPCA 2014-37).

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial conformado por mi tutor principal, el Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, el Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y la Dra. María del Rocío Bautista Pérez por el gran apoyo que me otorgaron, por su paciencia y dedicación y sobre todo por apoyarme en mi crecimiento profesional e intelectual.

Agradecimientos.

Agradezco a los miembros del jurado por la revision de esta tesis.

Presidente. Dra. Martha Franco Guevara

Vocal (1): Dra María Luisa Escobar Sánchez

Secretario: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Vocal (2). Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval

Vocal (3). Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Agradecimientos a título personal.

Agradezco a la Dra. María Luisa Escobar Sánchez por su amistad y por el apoyo técnico que fue esencial y sumamente valioso en la realización de este proyecto de Investigación.

Agradezco a la M en C. Damaris Ilhuicatzí Alvarado por su amistad y por el apoyo técnico y asesoría en la realización de procedimientos para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a la técnico académico Imelda Juárez Avelar por la asesoría técnica otorgada para la realización de este proyecto de investigación.

Dedicatoria.

Dedico este trabajo a Dios por el don de la vida y por permitirme concluir esta etapa profesional.

También dedico este trabajo a mi familia por su apoyo y por su cariño en cada uno de las etapas que comprendieron este posgrado y que me permitieron concluir esta etapa de mi formación profesional.

ÍNDICE.

1	Resumen.	1
1.1	Abstract.	3
2	Introducción.	5
2.1	Regulación de la presión arterial.	5
2.2	Fisiología renal.	6
2.2.1	Reabsorción tubular.	9
2.2.2	Inervación renal.	10
2.3	Participación del riñón en la regulación de la presión arterial.	11
2.4	Alteraciones renales en la HTA.	13
2.4.1	Daño glomerular secundario a la HTA.	14
2.4.1.1	Daño a los podocitos por la HTA.	15
2.4.1.2	Daño a las células mesangiales por la HTA.	16
2.4.2	Alteraciones renales túbulo intersticiales asociadas a la HTA.	16
2.5	Ciclooxigenasas.	18
2.5.1	Regulación de la expresión de las COXs.	19
2.5.2	Prostanoides derivados de las COXs.	22
2.5.3	Contribución de las COXs a la patogénesis de la HTA.	23
2.6	Sistema renina angiotensina.	24
2.6.1	Componentes del SRA.	25
2.6.2	Participación del SRA en alteraciones renales por la HTA.	30

2.7	Modelo ratas espontáneamente hipertensas.	31
2.7.1	Alteraciones morfo-funcionales en SHR prehipertensas.	32
3	Objetivos	35
4	Antecedentes	36
5	Metodología	38
5.1	Material Biológico	38
5.2	Administración del tratamiento farmacológico	38
5.3	Medición de la presión arterial	39
5.4	Eutanasia de los animales y disección del tejido renal	39
5.5	Concentraciones plasmáticas de Angiotensina II y angiotensina (1-7)	40
5.6	Técnica histológica	40
5.7	Tinciones histológicas	41
5.8	Evaluación de la ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión.	41
5.9	Inmunohistoquímica de COX-2 y renina	41
5.10	Inmunohistoquímica del receptor renina prorenina	42
5.11	“Western Blot” de Renina y COX-2	42
5.12	Análisis estadístico	43
6	Resultados	44
6.1	Evaluación de la presión arterial.	44
6.2	Etapa prehipertensa 6 semanas de edad	44
6.2.1	Determinación de niveles plasmáticos de Ang II, Ang (1-7), urea y creatinina.	44
6.2.2	Histopatología renal	46

6.2.3	Microscopia electrónica	50
6.2.4	Inmunolocalización de PRR, renina y COX-2	52
6.2.5	Cuantificación relativa del contenido de renina y COX-2 por “Western Blot”.	55
6.3	Tratamiento farmacológico con celecoxib y captopril	57
6.3.1	Evaluación de la presión arterial a ratas tratadas con celecoxib y captopril	57
6.3.2	Evaluación Histopatológica de los grupos tratados farmacológicamente.	58
7	Discusión	62
8	Conclusiones	70
9	Referencias bibliográficas.	71
10	Apéndices	80
11	Anexo. (Artículo de requisito)	85

Glosario de abreviaturas.

AMPC	Adenosín monofosfato cíclico.
Ang I	Angiotensina I.
Ang II	Angiotensina II.
AP-2	Factor de transcripción AP-2.
AT₁	Receptor de angiotensina-1.
AT₂	Receptor de angiotensina-2.
C/EBP	Factor de transcripción C/EBP.
COX	Ciclooxigenasa.
COX-1	Ciclooxigenasa -1.
COX-2	Ciclooxigenasa -2.
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico.
DP	Receptor membranar de prostaglandina D ₂ .
ECA	Enzima convertidora de angiotensina.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EP1, EP2, EP3 y EP4	Receptores membranales de prostaglandina E ₂ .
ERC	Enfermedad renal crónica
ET-1	Endotelina-1
GC	Gasto cardíaco
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FP	Receptor membranar de prostaglandina F _{2α} .
GFR	Tasa de filtración glomerular.
HTA	Hipertensión arterial.
HIFα	Factor α inducible por hipoxia
iECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.
IP	Receptor membranar de prostaglandina I ₂ .
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogenos.
MBD	Dominio de unión a membrana.

mPGE1	Sintasa 1 microsomal de PGE.
NaCl	Cloruro de sodio.
NF-κB	Factor nuclear κB.
NHE-3	Intercambiador de sodio-hidrógeno
NOS	Sintasa de óxido nítrico
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica.
PAS	Presión arterial sistólica.
PBS	Amortiguador de fosfatos
PEA3	Factor de transcripción PEA3.
PGD₂	Prostaglandina D ₂ .
PGDS	Prostaglandina D sintasa.
PGE₂	Prostaglandina E ₂ .
PGES	Prostaglandina E sintasa.
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α} .
PGFS	Prostaglandina F sintasa.
PGG₂	Prostaglandina G ₂ .
PGH₂	Prostaglandina H ₂ .
PGI₂	Prostaglandina I ₂ ó prostaciclina.
PGIS	Prostaglandina I sintasa.
PKC	Proteína cinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PPAR	Receptor activado por peroxisoma.
PPARγ	Receptor activado por peroxisoma γ .
PPARδ	Receptor activado por peroxisoma δ .
PRR	Receptor de renina-prorenina
RBF	Flujo sanguíneo renal.
RNA_m	RNA mensajero.
RVT	resistencias periféricas totales.

SRA	Sistema renina-angiotensina.
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas.
SNC	Sistema nervioso central
SP-1	Factor de transcripción SP-1.
TFG	Tasa de filtración glomerular
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP	Receptor membranal de tromboxano.
TXA₂	Tromboxano A ₂ .
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.
WKY	Ratas normotensas wistar kyoto.
WT₁	Factor de la transcripción de tumor de Wilm

1. RESUMEN.

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad muy común, con un impacto importante en la salud pública debido a complicaciones como el daño vascular y renal. Entre los modelos de estudio utilizados para estudiar esta enfermedad se encuentra la cepa de ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés), que presenta HTA primaria y alteraciones renales desde edades tempranas. Entre los mecanismos encargados de regular la presión arterial de manera normal y en condiciones patológicas, se encuentran el sistema ciclooxygenasas-prostanoides y el sistema renina-angiotensina (SRA). La ciclooxygenasa (COX) es una enzima responsable de la regulación de los sistemas renal y cardiovascular a través de la formación de prostanoides y de su influencia sobre el SRA, el cual tiene un papel crucial en el control de la presión sanguínea sistémica. Se ha descrito la participación del SRA y las COXs en alteraciones morfológicas y funcionales en el riñón asociadas con la hipertensión arterial en varios modelos animales. En este trabajo se estudió el papel de COX-2 y de los diferentes componentes del SRA en las alteraciones morfológicas y funcionales renales, durante el inicio y establecimiento de la hipertensión arterial primaria. En las SHR y sus controles normotensos WKY, se determinaron las alteraciones renales asociadas con el desarrollo de la HTA y la participación de COX-2 y renina a las 6 semanas de edad, cuando las SHR aún son normotensas y a las 12 semanas de edad, cuando la HTA se está estableciendo. La participación de COX-2 se evaluó mediante la inhibición de COX-2 con el fármaco celecoxib y la participación de SRA se evaluó inhibiendo a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (iECA), el fármaco captopril. A las ratas se les midió la presión arterial sistólica en estado consciente por pletismografía no invasiva, la función renal se evaluó mediante la cuantificación de urea y creatinina en plasma. Se evaluaron alteraciones en la estructura renal mediante el análisis de cortes histológicos con tinciones generales y tinciones específicas. Se realizó la detección de COX-2 por inmunofluorescencia y la de renina y el receptor de renina prorenina (PRR) por inmunohistoquímica y se evaluaron diferencias en la localización de las proteínas. En una segunda parte se realizó la administración de celecoxib y captopril a ratas WKY y SHR desde la semana 4 hasta la semana 12 para evaluar el efecto de los fármacos en la presión arterial y la morfología renal.

En este estudio las SHR de 6 semanas de edad no mostraron diferencia en los niveles de presión arterial respecto a la cepa WKY manteniéndose en el rango normal, sin embargo a nivel renal mostraron cambios morfológicos como, el incremento en el área glomerular, acumulación de matriz extracelular, hiperplasia de células mesangiales y células epiteliales tubulares, engrosamiento de la membrana basal glomerular e hipertrofia vascular. Además se demostró una mayor inmunolocalización y expresión de COX-2 en la corteza renal de la cepa SHR. No se observaron cambios en la inmunolocalización de renina; sin embargo, la expresión de renina inmadura se incrementó mientras que la cantidad de renina madura disminuyó en la corteza renal de las SHR. La proteína de PRR fue detectada principalmente en células epiteliales tubulares en ambas cepas, pero la inmunolocalización de este receptor parece estar incrementada en los glomérulos de las SHR. Estos cambios se asociaron con incremento en los niveles de Ang II y disminución de la Ang (1-7), sin embargo en esta edad, no se encontró evidencia de alteraciones en la función renal al evaluar los niveles plasmáticos de urea y creatinina. A las 12 semanas de edad, la presión arterial de las SHR aumentó significativamente con respecto a la cepa WKY; la inhibición de la ECA con captopril previnó este aumento, pero no así, la inhibición de COX-2 con celecoxib. La inhibición de la COX-2 contribuyó a la normalización del área de los glomérulos y en el grosor de la membrana basal glomerular, mientras que la inhibición de la ECA no modificó dichas alteraciones estructurales. En este trabajo mostramos evidencia de alteraciones morfológicas en la corteza renal de SHR en una edad prehipertensa, sobreactivación de SRA y aumento en la expresión de COX-2. Se demostró que la COX-2 participa en las alteraciones glomerulares presentes en las SHR, pero no en el aumento de la presión sanguínea, mientras que la Ang II está involucrada en el aumento de la presión sanguínea en esta cepa, pero no en las alteraciones glomerulares. Sin embargo no se descarta la participación de otros componentes del SRA en el desarrollo de las alteraciones renales encontradas, por lo que es necesario realizar más estudios para conocer los factores que contribuyen al desarrollo de la HTA en la cepa SHR.

1.1 ABSTRACT.

Arterial hypertension (HTN) is a very common disease, with a significant impact on public health due to complications such as vascular and kidney damage. The spontaneously hypertensive rat strain (SHR) is a model of hypertension which presents primary hypertension and kidney disorders from an early age. There are different mechanisms responsible for regulating blood pressure in normal and in pathological conditions, as the cyclooxygenase-prostanoid system and the renin-angiotensin system (RAS). Cyclooxygenase (COX) is an enzyme responsible for the regulation of the renal and cardiovascular systems through the formation of prostanoids and its influence on the RAS, which has a crucial role in the control of systemic blood pressure. The participation of the RAS and COXs in morphological and functional alterations in the kidney associated with arterial hypertension has been described in several animal models. In this work, the role of COX-2 and RAS components in renal morphological and functional alterations was studied, during the onset and establishment of primary arterial hypertension. In the SHR and their normotensive WKY controls, were determined the renal alterations associated with the development of hypertension and the role of COX-2 and renin at 6 weeks old, when the SHRs are still normotensive, and at 12 weeks old, when HTA is being established. The participation of COX-2 was evaluated by inhibiting COX-2 with the drug celecoxib and the participation of RAS was evaluated by inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE), with the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi), the drug captopril. Systolic blood pressure was measured in rats by non-invasive plethysmography and renal function was assessed by quantification of plasma urea and creatinine. Alterations in renal structure were evaluated by analyzing histological sections with general and specific stains. COX-2 and renin detection was performed by immunofluorescence and prorenin renin receptor (PRR) by immunohistochemistry and differences in protein expression were evaluated by Western Blot. In a second scheme, celecoxib and captopril were administered to WKY and SHR rats from 4 to 12 weeks old to evaluate the effect of the drugs on blood pressure and renal morphology.

In this study, 6 weeks old SHR group showed no difference in blood pressure levels compared to the WKY strain, remaining within the normal range; however, they showed morphological changes such as an increase in the glomerular area, matrix accumulation extracellular, hyperplasia of mesangial cells and tubular epithelial cells, thickening of the glomerular basement membrane and vascular

hypertrophy. In addition, a greater immunolocalization and expression of COX-2 in the renal cortex of the SHR strain was demonstrated. No changes in renin immunolocalization were observed; however, the expression of immature renin increased while the amount of mature renin decreased in the renal cortex of SHRs. The PRR protein was detected mainly in tubular epithelial cells in both strains, but the immunolocalization of this receptor seems to be increased in the glomeruli of SHR. These changes were associated with increased levels of Ang II and decreased Ang (1-7), however at this age, no evidence of changes in renal function was found when evaluating plasma levels of urea and creatinine. At 12 weeks old, the blood pressure of the SHRs was significantly increased relative to the WKY strain; ACE inhibition with captopril prevented this increase, but COX-2 inhibition with celecoxib did not. COX-2 inhibition contributed to normalization of glomerular area and glomerular basement membrane thickness, while ACE inhibition did not modify these structural alterations. In this work we show evidence of morphological alterations in the renal cortex of SHR in a prehypertensive age, overactivation of SRA and increased expression of COX-2. COX-2 was shown to participate in the glomerular alterations present in SHR, but not in the increase in blood pressure, while Ang II is involved in the increase in blood pressure in this strain, but not in the glomerular alterations. However, the participation of other components of the RAS in the development of the renal alterations found is not ruled out, so it is necessary to carry out more studies to know the factors that contribute to the development of HTN in the SHR strain.

2. INTRODUCCIÓN.

La presión arterial elevada o hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica, con un impacto importante en la salud pública debido a las complicaciones asociadas a este padecimiento. La HTA es una enfermedad que se caracteriza por la elevación persistente de la presión arterial sistémica. El diagnóstico de esta patología se establece cuando la presión arterial sistólica es superior o igual a 140 mm Hg y/o la presión arterial diastólica es superior o igual a 90 mm Hg (Guyton, 2019).

La HTA causa daño a distintos niveles; sus principales complicaciones son el accidente vascular cerebral, la retinopatía hipertensiva, el daño vascular, que puede conducir a arteriosclerosis o a disección de la aorta, la insuficiencia cardíaca, el infarto de miocardio y, a nivel renal, la insuficiencia renal secundaria a la hipertensión arterial (Vázquez Vigoa, 2009).

Esta patología se clasifica en hipertensión primaria (esencial), cuando es originada por factores genéticos y ambientales no específicos e hipertensión secundaria cuando se conocen las causas que la originan. El 90-95 % del total de casos de HTA es de tipo primaria, mientras que solo el 5-10% de las pacientes padecen hipertensión secundaria (Diez Martínez, 2009).

La etiología de la HTA puede entenderse a partir de los factores que participan en la regulación de la presión arterial en condiciones normales.

2.1 Regulación de la presión arterial.

La presión arterial es resultado de dos procesos fisiológicos, uno cardíaco (el volumen minuto o gasto cardíaco [GC]) y otro vascular (las resistencias periféricas totales [RVT]), de manera que la modificación de cualquiera de estos procesos produce cambios en la presión arterial. El GC y RVT son procesos multi-regulados en los que intervienen el sistema nervioso autónomo, los centros bulbares y de la protuberancia, así como factores humorales hormonales, moléculas vasoactivas de acción local y sistémica y de manera importante la función del riñón. Cada uno de estos sistemas reguladores actúa a través de diferentes mecanismos, forma y periodos temporales, sin embargo,

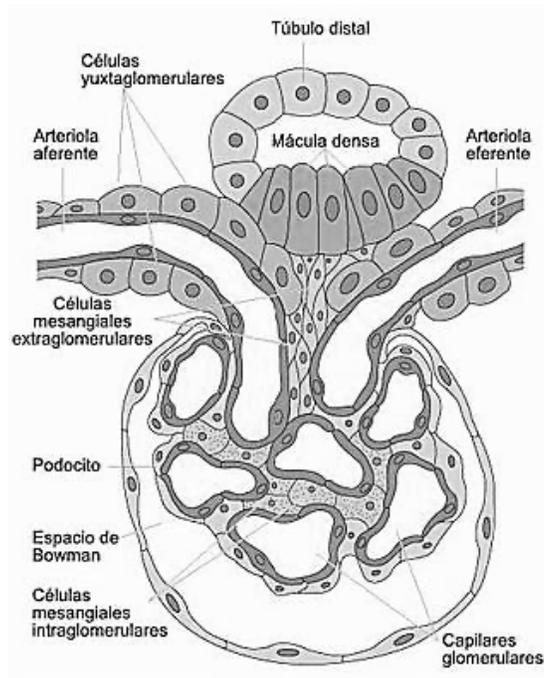
todos en conjunto y de manera integrada participan en el mantenimiento de la homeostasis de la presión arterial (Lahera y Diaz, 2009).

2.2 Fisiología renal.

El sistema renal esta formado por los riñones, los uréteres y la uretra. En total, el sistema renal filtra aproximadamente 200 L de plasma al día desde el flujo sanguíneo renal, lo que permite que las toxinas, productos de desecho metabólico y el exceso de iones sean excretados, mientras que mantienen sustancias esenciales en la sangre. El sistema renal regula la osmolaridad del plasma al modular la cantidad de agua, los solutos y electrolitos en la sangre y asegura a largo plazo el balance ácido-base. Otra de las funciones del sistema renal es la producción de eritropoyetina que estimula la producción de eritrocitos, produce renina para la regulación de la presión sanguínea y es responsable de la conversión de la vitamina D a su forma activa (Ogobuiro y Tuma, 2022).

La unidad estructural y funcional de los riñones son las nefronas. En en cada riñón hay alrededor de dos millones de nefronas, cada una está compuesta por: un corpúsculo renal formado por el glomérulo de Malpighi y la cápsula de Bowman, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, y el túbulo contorneado distal. Las nefronas desembocan en los túbulos colectores (Guyton, 2019).

El glomérulo es una densa red de capilares arteriosos (Esquema 1). El capilar que llega al glomérulo se denomina arteria aferente, mientras que el que sale, arteria eferente. Al ser la arteria eferente de menor calibre que la aferente, la sangre por la presión generada se filtra a través de las paredes de los capilares que trabajan a modo de un filtro (Guyton, 2019).



Esquema 1. Detalles estructurales del glomérulo. Corte a través del polo vascular, se muestran las asas capilares y el aparato yuxtaglomerular (Tomado de Guyton, 2019).

La filtración glomerular es el proceso inicial en la producción de orina, es un proceso pasivo en el que la presión hidrostática empuja el fluido y los solutos a través de una membrana sin requerimiento de energía. La membrana de filtración tiene 3 capas: un endotelio fenestrado de los capilares glomerulares que permite el paso de los componentes de la sangre excepto las células, la membrana basal que está cargada negativamente y actúa como una barrera física que previene el paso de las proteínas y los pedicelos de los podocitos que crean una filtración más selectiva. La presión hidrostática en los capilares glomerulares es la principal fuerza de filtración con una presión de 55 mmHg (Ogobuiro y Tuma, 2022).

La tasa de filtración glomerular (TFG) es el volumen de fluido filtrado por minuto y depende de la presión de filtración neta, del área total de la superficie de filtración disponible y de la permeabilidad de la membrana de filtración. La TFG normal se encuentra entre 120 y 125 ml/min y esta regulada a través de un mecanismo miogénico y a través de un mecanismo de retroalimentación túbulo glomerular. El mecanismo miogénico regula la TFG contrayendo la arteriola aferente cuando el

músculo liso vascular se estira por un aumento de la presión sanguínea y dilata el músculo liso vascular cuando la presión es baja para permitir el paso de un mayor volumen de sangre.

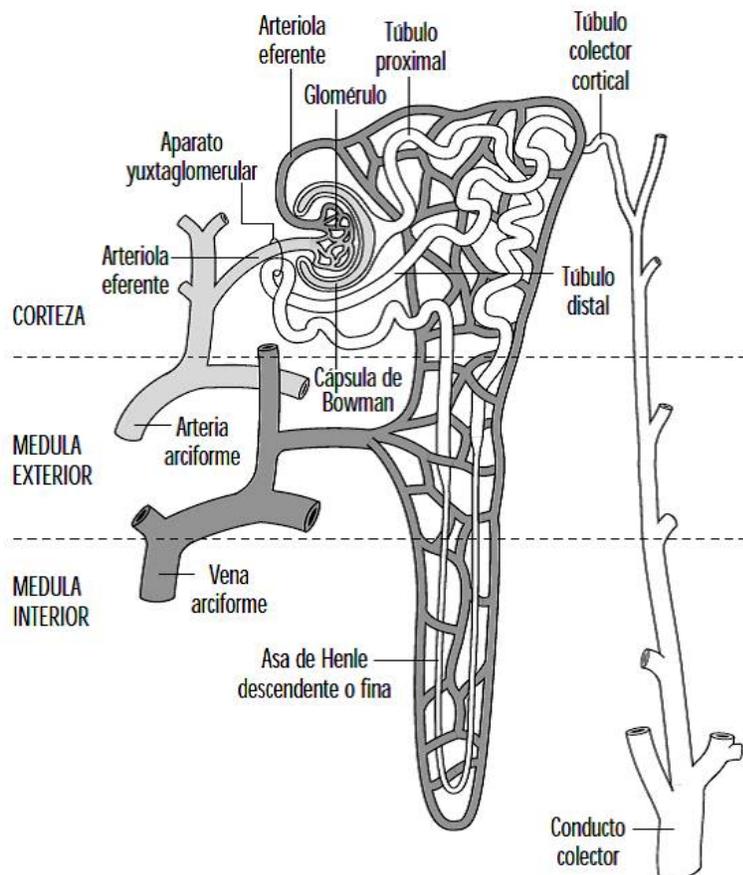
El mecanismo de retroalimentación túbulo glomerular regula la TFG al detectar la cantidad de NaCl dentro de los túbulos. Las células de la mácula densa son un sensor del NaCl alrededor del túbulo contorneado distal de la nefrona. Cuando la presión sanguínea aumenta, también aumenta la TFG esto disminuye el tiempo de reabsorción del sodio y por lo tanto la concentración de sodio es alta en los túbulos, la mácula densa detecta este aumento y libera vasoconstrictores que contraen al arteriola aferente y disminuyen el flujo sanguíneo. En el caso contrario en el que la presión sanguínea es baja, el sodio se reabsorbe en mayor cantidad causando que disminuya su concentración en los túbulos y la mácula densa no libera sustancias vasoconstrictoras (Ogobuiro y Tuma, 2022).

El control extrínseco mantiene la TFG y también mantiene la presión sanguínea sistémica a través del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Cuando el volumen del fluido extracelular disminuye excesivamente la norepinefrina y la epinefrina se liberan y producen vasoconstricción, lo que ocasiona la disminución del flujo sanguíneo hacia el riñón y la disminución de la TFG.

La activación del SRA se presenta cuando la presión sanguínea disminuye y se lleva a cabo a través de 3 mecanismos principales. El primero es la activación del receptor beta 1 adrenérgico que causa la liberación de la renina de las células yuxtglomerulares del riñón. El segundo mecanismo es el de las células de la mácula densa que promueven la liberación de renina de las células yuxtglomerulares cuando detectan la caída de la concentración de NaCl durante la disminución del flujo sanguíneo hacia el riñón. El mecanismo que utiliza la mácula densa, ocurre por medio de la liberación de las prostaglandinas E_2 e I_2 productos de la COX-2. El tercer mecanismo es el estiramiento de los baroreceptores presentes alrededor de las células yuxtglomerulares que detectan una disminución en la tensión durante la disminución del flujo sanguíneo hacia el riñón y también activan la liberación de la renina regulando así la filtración glomerular (Ogobuiro y Tuma, 2022).

2.2.1 Reabsorción tubular.

Los cuatro segmentos tubulares de la nefrona tienen propiedades absorbivas únicas (Esquema 2). El primer segmento es el túbulo contorneado proximal en este fragmento las células tienen la mayor capacidad absorbiva, en circunstancias normales el túbulo contorneado proximal reabsorbe toda la glucosa y los aminoácidos, así como el 65% de sodio y agua. El sodio se reabsorbe mediante un transporte activo primario a través de una bomba basolateral $\text{Na}^+\text{-K}^+$. En este fragmento la glucosa, los aminoácidos y las vitaminas se reabsorben mediante un transporte activo secundario con Na^+ y un gradiente electroquímico. El agua es reabsorbida por ósmosis y depende de la reabsorción de otros solutos. También se reabsorben solutos liposolubles y urea mediante difusión pasiva (Ogobuiro y Tuma, 2022).



Esquema 2. Diagrama de una nefrona yuxtamedular. Se muestran los principales componentes de la nefrona y la circulación renal (Tomado de Hemstreet, 2001).

El filtrado no absorbido en el tubulo pr3ximo se mueve hacia el asa de Henle. Esta regi3n se divide funcionalmente en una regi3n descendente y un ascendente. En la porci3n descendente se reabsorbe el agua por un mecanismo de 3smosis, este proceso es posible por la abundancia de aquaporinas en esta regi3n, pero no hay reabsorci3n de solutos en esta parte. Sin embargo en la regi3n ascendente en el segmento delgado, el sodio se mueve por un mecanismo pasivo a favor de su gradiente de concentraci3n y tambi3n el sodio, el potasio y los cloruros son reabsorbidos juntos a trav3s de un mecanismo simporte en la porci3n gruesa ascendente. La presencia de una bomba Na-K-ATPasa en la membrana basolateral mantiene este simporte funcional al crear un gradiente i3nico. En la porci3n ascendente tambi3n se lleva a cabo la reabsorci3n de calcio y magnesio por un mecanismo de difusi3n pasiva paracelular que depende del gradiente electroqu3mico. En la porci3n ascendente no se reabsorbe agua (Ogobuiro y Tuma, 2022).

El siguiente fragmento tubular de la nefrona, corresponde al t3bulo contorneado distal. En esta porci3n se lleva a cabo un transporte activo primario de sodio en la membrana basolateral y un transporte activo secundario en la membrana apical por un mecanismo simporte $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ y por canales, este proceso es regulado por aldosterona en la porci3n distal y tambi3n hay reabsorci3n de calcio por una captura pasiva controlado por la hormona paratiroidea. La aldosterona tiene como blanco las c3lulas de la porci3n distal causando s3ntesis de canales sodio y potasio as3 como la s3ntesis de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$.

En el t3bulo colector ocurre la 3ltima etapa de la reabsorci3n. En esta parte se lleva a cabo un transporte activo primario de sodio en la membrana basolateral y tambi3n un transporte activo secundario en la membrana apical mediante un simporte $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ y canales regulados por aldosterona (Ogobuiro y Tuma, 2022). Una vez que la producci3n de orina se ha completado, es transportada hacia los ur3teres para su almacenaje en la vejiga (Ogobuiro y Tuma, 2022).

2.2.2 Inervaci3n renal.

El ri3n3n se conecta al sistema nervioso a trav3s de los nervios renales. Los nervios contienen muchas fibras eferentes simp3ticas y unas cuantas fibras aferentes. La inervaci3n preganglionar simp3tica

proviene casi completamente de los segmentos torácicos inferiores y lumbares superiores de la médula espinal. Los cuerpos celulares de las neuronas posganglionares se ubican en la cadena ganglionar simpática, en el ganglio mesentérico superior y a lo largo de la arteria renal. Las fibras simpáticas se distribuyen principalmente en las arteriolas aferentes y eferentes, en los túbulos proximales y distales y en las células yuxttaglomerulares. Además, hay una densa inervación noradrenérgica en el segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle (Guyton, 2019).

2.3 Participación del riñón en la regulación de la presión arterial.

De todos los sistemas que contribuyen a la regulación de la presión arterial, aquellos implicados en la función renal tienen una importancia especial, lo que llevó al fisiólogo Arthur Guyton a exponer que la HTA se debe predominantemente a alteraciones en este órgano (Guyton, 1987), sin embargo Guyton también estableció que otros factores como el incremento en el tono simpático, cambios en la concentración de hormonas circulantes como: la aldosterona, la vasopresina o el péptido natriurético auricular, así como, cambios en los niveles de electrolitos pueden modificar la función renal (Harrison 2013; Cowley, 2006).

Las acciones del riñón sobre la presión arterial se ejercen mediante dos mecanismos principales: la regulación del contenido líquido del organismo y la producción de sustancias vasoactivas con efectos locales y sistémicos. La integración del riñón con el sistema vascular en un mecanismo sistémico de regulación del contenido de agua y sal del organismo, implica una respuesta renal a los cambios sistémicos, así como a las acciones del riñón sobre la hemodinámica general y el llenado vascular. Ambos sistemas renal y circulatorio, se retroalimentan y están estrechamente relacionados por lo que no pueden considerarse de manera aislada (Lahera y Diaz, 2009).

El aparato circulatorio es un sistema cerrado con un sector aferente arterial de alta presión y alta resistencia y un sector eferente venoso, de baja presión y alta capacitancia (relativos al corazón). (Lahera y Diaz, 2009). La única vía de salida de líquidos del organismo estrictamente regulable es la formación de orina. El tejido renal está integrado dentro de la circulación arterial como un circuito de muy baja resistencia. Esto determina que a pesar de su escaso peso, el riñón reciba un aporte

sanguíneo elevado, equivalente al 20% del gasto cardíaco, lo que constituye el flujo por gramo de tejido más alto del organismo. Este flujo garantiza un máximo acceso de moléculas a depurar, así como un margen amplio para la regulación de volumen y el control de la presión arterial (Lahera y Diaz, 2009).

Ante un aumento de la presión arterial, el riñón responde aumentando la excreción de sodio y agua mediante el llamado mecanismo de natriuresis y diuresis de presión, lo que hace que la presión arterial regrese paulatinamente a sus valores normales. Este fenómeno se produce sin cambios en el filtrado glomerular ni en el flujo sanguíneo renal, por lo que se puede concluir que el incremento de la presión arterial determina un descenso de la reabsorción tubular de sodio (Lahera y Diaz, 2009). La natriuresis de presión se considera el punto clave de la regulación del volumen líquido total del organismo, de manera que una de las hipótesis de la patogénesis de la HTA propone un cambio en la eficacia de este proceso, que determina una disminución en la respuesta natriurética ante el aumento de la presión arterial (Lahera y Diaz, 2009).

La médula renal es la estructura anatómica donde se desarrolla la natriuresis por presión. Mientras que el flujo sanguíneo cortical posee un alto grado de autorregulación y puede mantenerse constante dentro de un intervalo amplio de presiones de perfusión, el flujo sanguíneo medular aumenta alrededor de un 5-10% cuando la presión de perfusión aumenta desde 80 a 160 mmHg. En estas circunstancias, se produce también un incremento de la presión en los vasos rectos modulares y una elevación en la presión hidrostática del intersticio medular, lo que determina un cambio funcional hacia un estado pro-natriurético. Esta visión de la organización renal vincula a las áreas corticales con el mantenimiento de la función depuradora y a las zonas medulares con el control del volumen líquido. Los estudios bioquímicos han demostrado, además, que la expresión y actividad enzimática de la sintasa de óxido nítrico (NOS), en sus tres isoformas, es considerablemente mayor en la médula que en la corteza renal, con particular intensidad a nivel de los túbulos colectores de la médula interna. Este hecho tiene relación directa con la regulación del flujo sanguíneo medular y de la excreción de sodio y agua.

2.4 Alteraciones renales en la HTA.

La HTA constituye la segunda causa de enfermedad renal crónica (ERC), superada únicamente por la diabetes mellitus (DM), de manera que el 29 % de los pacientes que llegan a enfermedad renal terminal son provocados por HTA (Vázquez Vigoa, 2009). El aumento de la presión arterial (PA) sistémica se asocia a un mayor riesgo de enfermedad renal debido su transmisión hacía la nefrona que es la unidad estructural y funcional del riñón. El aumento de la presión arterial sistémica, ya sea sistólica o diastólica, puede ocasionar alteraciones en la función de arterias de bajo calibre como son los capilares glomerulares en el riñón (Wolley y Stowasser, 2016; Hultström, 2012).

La presión glomerular capilar depende del equilibrio de las presiones preglomerulares y postglomerulares y el individuo hipertenso responde con una vasoconstricción aferente de defensa ante un aumento de la PA para impedir que esta se transmita al glomérulo, pero este mecanismo se agota con el tiempo, lo cual permite se eleve la presión capilar glomerular y el riñón quede expuesto a su efecto nocivo. En una persona hipertenso, la función renal se puede ver afectada por nefroangioesclerosis y por daño tubulointersticial secundario a la vasoconstricción aferente (Vázquez Vigoa, 2009).

El riñón al ser altamente vascularizado es uno de los principales órganos blanco de la HTA. Las alteraciones renales ocasionadas por la hipertensión arterial primaria implican enfermedades vasculares como la nefroangiosclerosis, nefrosclerosis o nefropatía hipertensiva, así como hialinosis con daño glomerular. Además, recientemente varios estudios demuestran que la HTA también ocasiona alteraciones en las células tubulares induciendo la transición epitelio mesénquima y fibrosis túbulo-intersticial. A nivel glomerular se reporta el aplanamiento y la pérdida de podocitos que ocasiona la pérdida de la integridad de la barrera de filtración y adhesiones focales de los capilares hacia la cápsula de Bowman, lo que conduce a fibrosis y por lo tanto a la reducción del área de filtración glomerular (Seccia y cols., 2017).

Las alteraciones vasculares en la HTA producen un aumento en la vasoconstricción de arterias renales de bajo calibre, isquemia glomerular (retracción del ovillo con esclerosis focal o global) y en

algunas zonas, fibrosis intersticial y atrofia tubular (Marín R y cols., 2010; Querfeld y cols., 2020). Otros autores, señalan que la hialinización de las arteriolas aferentes provoca inicialmente vasodilatación, hipertrofia glomerular y a largo plazo glomerulosclerosis lo que favorece la aparición de proteinuria y la progresión de la enfermedad (Marín R y cols., 2010).

2.4.1 Daño glomerular secundario a la HTA.

Se ha descrito un amplio espectro de lesiones glomerulares en la hipertensión. Los lados opuestos de las alteraciones incluyen glomérulos pequeños y escleróticos inducidos por aterosclerosis e isquemia y por otro lado glomérulos grandes incrustados con matriz extracelular asociados a glomerulosclerosis focal segmental. Otros patrones de glomerulopatía hipertensiva son glomérulos con el penacho glomerular colapsado totalmente o parcialmente y la acumulación de material extracelular en el espacio de Bowman. Glomérulos con el penacho glomerular expandido completamente reemplazado por colágena y glomérulos con adhesiones capsulares, cicatrices segmentales e hialinosis.

Cualquier cambio que implica a los vasos de pequeño calibre se traduce en alteraciones en la estructura del glomérulo. El adelgazamiento de la arteriola aferente en la hipertensión ocasiona isquemia parcial del penacho glomerular que se vuelve más pequeño y gradualmente reduce su superficie de filtración, sin embargo, la hiperfiltración y la hipertrofia de las nefronas sanas permiten que el riñón siga funcionando. Cuando la hialinosis es la principal alteración que afecta a la arteriola aferente en la hipertensión, los glomérulos se hipertrofian con aumento de tamaño del penacho glomerular y oclusión de los capilares por material hialino que ocasiona la acumulación de matriz extracelular periglomerular y glomerulosclerosis focal segmental (Seccia y cols., 2017)

La hipertensión ejerce una acción directa sobre las estructuras glomerulares, activando la señalización de respuestas adaptativas en las células endoteliales glomerulares, en las células mesangiales y principalmente en los podocitos, como son contracción, aumento de la actividad transcripcional (de proteínas de matriz extracelular como la osteopontina y de las integrinas $V\alpha$, $\beta 1$

y $\beta 3$), proliferación, engrosamiento de la membrana basal y fibrosis intersticial (Endlich, 2012; Kitching y Hutton, 2016).

De acuerdo con numerosos estudios, la fibrosis intersticial y glomerular es la alteración patológica más común a nivel renal y se caracteriza por la sustitución progresiva del parénquima por tejido cicatricial no funcional y es causada por el desbalance entre proliferación y apoptosis celular, así como por la pérdida del equilibrio normal entre la síntesis y la degradación de proteínas de matriz extracelular principalmente colágena tipos I, IV y V, laminina A, B1 y B2, fibronectina, heparán sulfato y proteoglicanos. Las células implicadas en la producción de matriz extracelular en la fibrosis renal son las células mesangiales, podocitos y miofibroblastos formados por la transición epitelio mesénquima de las células epiteliales tubulares (Nogueira y cols., 2017; Sutariya y cols., 2016). Uno de los eventos más importantes en la fibrosis renal es el aumento en la expresión del gen del TGF- $\beta 1$, dicho factor de crecimiento al unirse a su receptor, activa vías de señalización implicadas en crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y formación de matriz extracelular (López-Hernández y López-Novoa, 2012).

2.4.1.1 Daño a los podocitos por HTA

Los podocitos son células epiteliales que forman parte de la barrera hemato-glomerular contra la pérdida de proteínas. Los pedicelos de podocitos vecinos se intercalan y a través de su interconexión por uniones celulares forman el diafragma de hendidura proporcionando una barrera de filtración selectiva al tamaño de las moléculas. Varias proteínas de los podocitos incluyendo la podocina, la nefrina, la sinaptopodina y la podocalixina mantienen la integridad estructural y funcional del diafragma de hendidura a través de interacciones complejas. Debido a que los podocitos son células maduras diferenciadas su pérdida resulta en un daño irreversible (Greka y Mundel, 2012).

El daño a la barrera de filtración ocasiona también daño a los podocitos, los que sufren la reducción de los pedicelos hasta que la célula parece plana y alargada. Conforme el daño persiste los podocitos se desconectan, se separan de la membrana basal o sufren apoptosis causando áreas desnudas de membrana basal lo que contribuye a la proteinuria (Greka y Mundel, 2012).

El principal factor que ocasiona la separación de los podocitos es la hipertensión capilar que causa estrés por el aumento de la tensión hacia la circunferencia de los capilares y en dirección axial del flujo lo que determina la hipertrofia glomerular y la hiperfiltración. La hiperfiltración aumenta el estrés de fricción (“*shear stress*”) y la hipertrofia glomerular obliga a los podocitos a cubrir áreas más grandes y remotas de la membrana basal glomerular. El alargamiento de la superficie de los podocitos determina el aplanamiento de las prolongaciones celulares y su pérdida. La presión intraglomerular ocasiona la formación de protuberancias de la membrana basal glomerular desnudada hacia afuera, favoreciendo adhesiones focales del penacho glomerular hacia la hoja externa de la cápsula de Bowman, glomerulosclerosis y finalmente ocasiona proteinuria (Greka y Mundel, 2012).

Además del estrés mecánico otros factores que pueden contribuir al daño a los podocitos son el estrés oxidativo, la inflamación, factores metabólicos y vasoactivos, la angiotensina II y altas concentraciones de glucosa.

2.4.1.2 Daño a las células mesangiales por la HTA.

Las alteraciones en el glomérulo estimulan la proliferación de las células mesangiales, lo que contribuye a la inflamación túbulo intersticial y a agravar la glomeruloesclerosis. Las células mesangiales a su vez activan al sistema renina angiotensina local, lo que contribuye a estimular la producción del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y fibronectina, incrementando aún más la formación de matriz extracelular intra-glomerular y la fibrosis (Abboud, 2012).

2.4.2 Alteraciones renales túbulo intersticiales asociadas a la HTA.

En pacientes hipertensos se puede desarrollar un gran espectro de lesiones en las células del epitelio tubular. Éstas van desde tumefacción celular hasta la atrofia y finalmente la pérdida de células. Otras alteraciones incluyen células planas rodeando espacios abiertos llenos con eosinófilos.

El daño de la membrana basal de las células epiteliales tubulares permite el paso de los productos derivados de los túbulos al intersticio y a los espacios de los capilares peritubulares acelerando la fibrosis y la inflamación en estos sitios, mientras que las proteínas que llegan a ser filtradas por un glomérulo dañado pueden obstruir el flujo urinario y agravar el daño túbulo intersticial (Mennuni y cols., 2014).

Las células inflamatorias pueden estar dispersas o ser numerosas como en la pielonefritis crónica y pueden actuar como activadores de la fibrosis túbulo intersticial. Al estar comprimidos por la colágena los capilares peritubulares se atrofian y su distancia con las células tubulares aumenta empeorando el daño y favoreciendo el desarrollo de la falla renal (Mennuni y cols., 2014).

En 1998 Fine postuló la hipótesis de la hipoxia crónica, en la que propone que el daño que ocurre inicialmente a nivel glomerular debido a la hipertensión ocasiona daños en los capilares peritubulares postglomerulares que inducen daño endotelial e hipoxia. La disfunción en la microvasculatura induce un ambiente hipóxico que activa inflamación, transición epitelio mesénquima de las células tubulares con diferenciación a miofibroblastos y formación de fibrosis. Por lo que la hipoxia inducida por la hipertensión traslada el daño glomerular inicial a daño intersticial (Coffman 2011).

Las células epiteliales del túbulo proximal que son más susceptibles al daño por hipoxia que las células distales, ya que activan respuestas transcripcionales complejas y expresan genes implicados en la supervivencia y la adaptación (Coffman 2011).

El regulador maestro de la respuesta adaptativa es el factor α inducible por hipoxia (HIF α), un factor de transcripción heterodimérico que comprende una subunidad β y una subunidad α . Por efecto de la hipoxia, la proteína HIF α dimeriza con HIF β y se une a elementos de respuesta a hipoxia en regiones regulatorias de genes blanco que codifican para el TGF- β 1, colágenas y otras proteínas de matriz extracelular que ocasionan fibrosis (Johnson y cols., 2015).

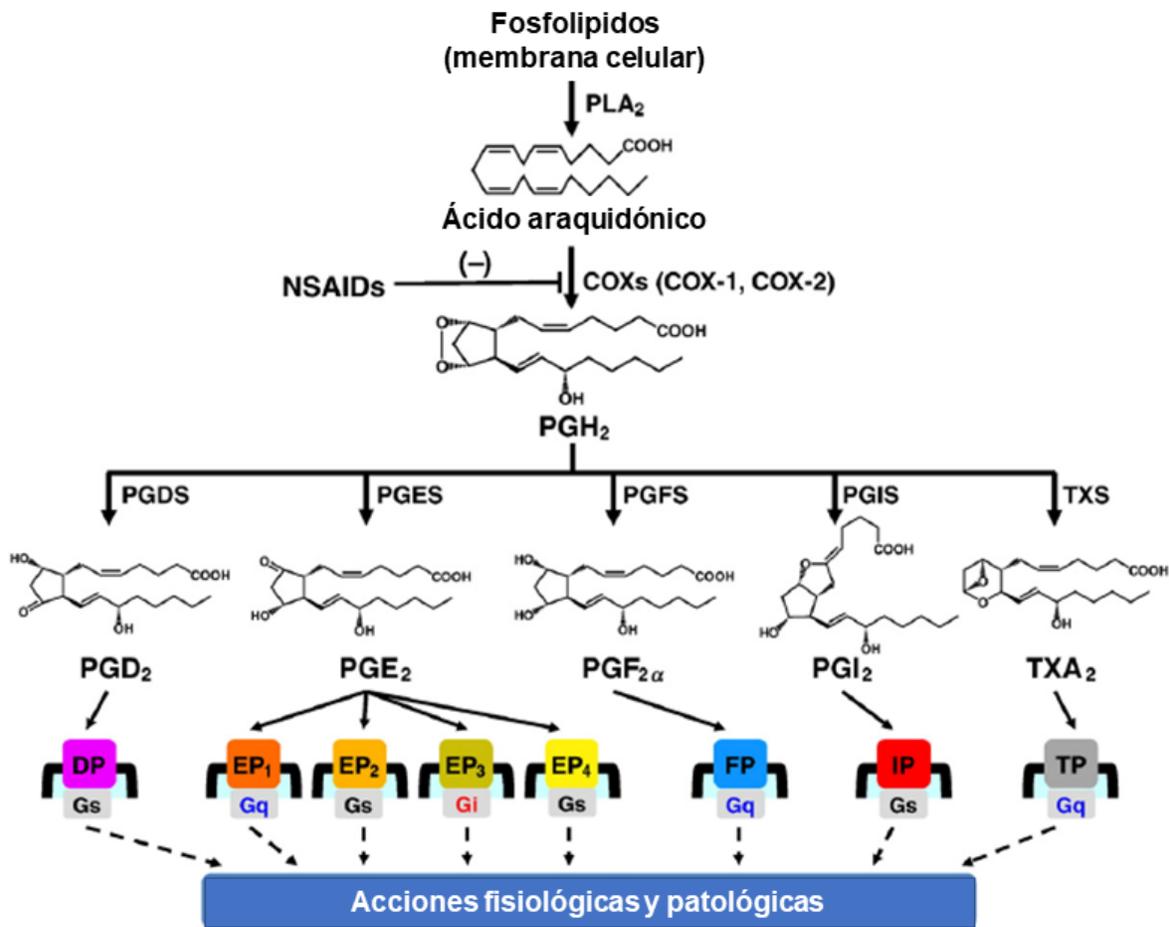
La hipoxia por sí misma activa a los fibroblastos residentes que favorecen la producción de colágena intersticial y la supresión de la degradación de matriz extracelular. Además de que la exposición de las células epiteliales del túbulo proximal a la hipoxia induce fenotipo de fibroblastos, promoviendo aún más la acumulación de colágena y el daño a las mitocondrias induciendo la pérdida celular por apoptosis. La hipoxia también induce la expresión de factores fibrogénicos como TGF- β 1, endotelina 1 (ET-1) y factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y angiopoyetina 4 que sinergizan entre ellos amplificando la respuesta fibrogénica (Johnson y cols., 2015).

En el riñón están presentes sistemas enzimáticos importantes como las ciclooxigenasas y el sistema renina angiotensina, esenciales en la función renal en condiciones normales y patológicas, a continuación, se describirán los aspectos más importantes de ambos sistemas.

2.5 Ciclooxigenasas.

Se han descrito dos isoformas de ciclooxigenasa, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), productos de diferentes genes con distintos patrones de expresión y regulación. COX-1 es considerada la isoforma constitutiva debido a su distribución generalizada, mientras que COX-2 se considera la forma inducible debido a su expresión restringida y su sobreexpresión por estímulos inflamatorios, factores de crecimiento, oncogenes y citocinas (Cheng y col. 2004).

Ambas enzimas catalizan una reacción de ciclooxigenasa en la que el ácido araquidónico se combina con dos moléculas de O_2 para convertirse en la prostaglandina G_2 (PGG_2) y una reacción de peroxidasa en la que se reducen dos electrones de la PGG_2 para convertirse en la prostaglandina H_2 (PGH_2) (Esquema 3). La PGH_2 es químicamente inestable, por lo que se transforma en las prostaglandinas E_2 (PGE_2), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandina I_2 (PGI_2) y el tromboxano A_2 (TXA_2), por acción enzimática de sintasas específicas, las cuales incluyen a la PGE sintasa (PGES), la prostaciclina sintasa (PGIS), la PGD sintasa (PGDS), la PGF sintasa (PGFS) y la sintasa de tromboxano (TXAS) (Nasrallah y cols., 2007; Smyth y cols., 2012).



Esquema 3. Vía de síntesis de los prostanoide y sus receptores. Se muestra la vía de síntesis de los prostanoide, desde la conversión del ácido araquidónico por las COXs hasta los receptores por los cuales ejercen su función (Tomado de Yuhki y cols., 2011).

2.5.1 Regulación de la expresión de las COXs.

En el riñón la COX-1 es altamente expresada en los conductos colectores, en células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman, en células intersticiales, en células mesangiales glomerulares y células endoteliales de las arteriolas. La COX-2 se expresa predominantemente en las células intersticiales de la médula, en células de la mácula densa, en la porción ascendente gruesa del asa de Henle y, en el humano, también se ha observado en podocitos y en células de músculo liso arteriolar (Harris, 2006).

COX-1 se considera como un gen constitutivo por su expresión constante en la mayoría de los tipos celulares y tejidos aunque en bajas concentraciones, a excepción del estómago y las plaquetas donde la expresión es mayor. La expresión de COX-2 es inducible en su mayoría, aunque también se expresa de manera constitutiva en algunos tipos celulares y en patologías como el cáncer (Yang y cols., 1998).

En el riñón la expresión de la COX-2 se regula diferencialmente en la corteza y en la médula; la restricción de sodio aumenta la expresión en la corteza y disminuye la expresión en la médula, mientras que, el incremento en el consumo de sal aumenta la expresión de la COX-2 de la médula interna, pero disminuye la expresión en la corteza. Esta expresión diferencial refleja las funciones distintas de los prostanoideos derivados de COX-2, contribuyendo en la médula a la reabsorción de sal y agua, así como a la regulación del flujo sanguíneo medular; mientras que en la corteza interviene en la liberación de renina y la hemodinámica glomerular (Yang y cols., 1998).

La sobreexpresión de COX-2 parece ser consecuencia del incremento en la transcripción y aumento en la estabilidad de su RNA mensajero. Promotores de tumores, factores de crecimiento, oncogenes y citocinas estimulan la transcripción del gen de COX-2 de manera dependiente de PKC (Simmons y cols., 2004). La región promotora del gen de COX-2 contiene una caja TATA y varios elementos de regulación transcripcional, como el factor nuclear kappa B (NF-κB), NF-IL6/C/EBP, PEA3, NFAT, CRE, AP-2 y SP-1; dependiendo del estímulo y del tipo celular, esos factores de transcripción estimulan la expresión de COX-2 (Chun y Surh., 2004; Simmons y cols., 2004; Tsatsanis y cols., 2006).

La región promotora de COX-2 contiene dos posibles sitios de unión para NF-κB y se ha demostrado que este factor de transcripción es un posible regulador de la expresión de COX-2 en macrófagos murinos y en líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano expuestos a lipopolisacáridos. Varios agentes que activan las MAPKs también activan NF-κB, lo que sugiere una interconexión entre estas vías y se propone que la MAPK ERK, una cinasa corriente arriba de JNKs, así como, la MAPK p38 son las principales reguladoras de la activación de la expresión de COX-2 (Chun y Surh, 2004; Chen y cols., 2004).

Los factores de transcripción C/EBP también están implicados en regular la actividad del promotor de COX-2. Hay un sitio de unión para C/EBP sobre el promotor del gen de COX-2 humano, en las posiciones 132/124 corriente abajo de un sitio adyacente a AP-2 que tiene un papel en la inducción de COX-2 por lipopolisacáridos y 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate o TPA (Inoue y cols., 1995; Wu, 2005).

El elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE, por sus siglas en Inglés) también se ha implicado en la inducción de COX-2 por bradicinina, en células de músculo liso arteriolar de pulmón (Bradbury, 2003); otro posible mecanismo para modular la expresión de COX-2 implica a los receptores activados por peroxisomas (PPAR, por sus siglas en Inglés), la activación de PPAR δ resultó en el incremento del RNAm de COX-2 y la expresión de su proteína en carcinoma hepatocelular humano, y los activadores de PPAR α también inducen la expresión de COX-2 en hígado de rata. La regulación de la expresión de COX-2 por PPARs es compleja y parece ser específico del tipo celular (Chun y Surh, 2004; Tsatsanis y cols., 2006).

Uno de los principales genes supresores de tumores p53, implicado en la progresión del ciclo celular, la integridad del DNA y la supervivencia celular, parece también estar implicado en la regulación de la expresión de COX-2. Basado en estudios in vitro, p53 inhibe la unión de la proteína de unión a TATA con la región promotora del gen de COX-2 al competir con la proteína de unión a TATA (Subbaramaiah y cols., 1999).

Por otra parte, también las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden activar la expresión de COX-2 en células endoteliales en un mecanismo mediado por la proteína morfogénica de hueso 4 (BMP-4), en donde COX-2 participa en la disfunción endotelial mediante la producción de prostanoïdes vasoconstrictores (Wong y cols., 2010). Se ha demostrado que la inhibición de COX-2 mejora la función endotelial en pacientes con HTA (Prabhakaran y Anad, 2003).

2.5.2 Prostanoides derivados de las COXs.

Los prostanoides son un grupo de reguladores lipídicos derivados del metabolismo enzimático del ácido araquidónico, iniciado por las COXs. Los prostanoides tienen funciones críticas al regular múltiples procesos celulares, como proliferación celular, diferenciación y apoptosis y en controlar la homeostasis del cuerpo; además tienen un papel importante en la fisiopatología de la inflamación, el cáncer y la hipertensión (Hao y Breyer, 2008). Los prostanoides son rápidamente degradados, esto limita su efecto a la vecindad de su sitio de síntesis en funciones autocrinas y paracrinas. Cada prostanoides actúa sobre un receptor de membrana específico, acoplado a proteínas G o sobre receptores nucleares como PPAR δ y PPAR γ (Hao y Breyer, 2008).

La distribución de las sintasas de prostanoides en el riñón está bien caracterizada. La presencia de la sintasa 1 microsomal de PGE (mPGE1) y COX-2 en la porción gruesa ascendente cortical de asa y en células intersticiales medulares sugiere que están funcionalmente acopladas y que esta sintasa contribuye a la biosíntesis de PGE₂ en estas células. Sin embargo, en los ductos colectores la mPGE1 inducible parece estar acoplada a COX-1 contribuyendo al incremento en la biosíntesis de PGE₂ en estas células (Hao y Breyer, 2008).

La PGE₂ es el prostanoides más abundante detectado en el riñón, seguido por PGI₂, PGF_{2 α} , y TxA₂; bajo condiciones basales COX-1 y COX-2 son responsables de la biosíntesis de prostanoides, sin embargo, en el riñón estimulado por Ang II la PGE₂ y la PGI₂ son producidos principalmente por acción de COX-2 (Qi y cols., 2006).

Los prostanoides ejercen sus funciones a través de receptores específicos, que comprenden una familia diversa de receptores membranales acoplados a proteínas G, estos incluyen los receptores para la PGD₂ (DP), tromboxano (TP), prostanglandina F_{2 α} (FP), prostanglandina I₂ (IP) y prostanglandina E₂ (EP), de estos últimos hay 4 subtipos EP; EP1, EP2, EP3 y EP4 (Hao y Breyer, 2008).

El receptor TP es un potente activador de la agregación plaquetaria y la constricción de músculo liso; mientras que el receptor IP tiene un potente efecto antitrombótico. Los receptores EP1 y EP3

son constrictores del músculo, mientras que los receptores EP2, EP4 e IP relajan el músculo liso, incluyendo la vasculatura (Smyth y cols., 2012).

Cada receptor de prostanoideos activa una vía de señalización acoplada a una proteína G diferente. Los receptores IP, DP, EP2 y EP4 están acoplados a proteínas G estimuladora (G_s) y su señalización se relaciona con incremento de los niveles de AMPc; mientras el receptor TP, FP y EP1 inducen movimiento de calcio, al menos en algunos tejidos. El receptor EP3 está acoplado a una proteína G inhibitoria (G_i) y reduce la síntesis de AMPc. Aunque algunos de estos receptores siguen la misma vía de segundos mensajeros, el blanco corriente abajo de la vía puede ser diferente llevando a efectos fisiológicos diferentes (Hao y Breyer, 2008).

Los receptores EP2 y EP4 o el IP parecen participar en el control del flujo sanguíneo medular al dilatar los vasos rectos (vasa recta), mientras que los receptores EP1 y EP3 parecen mediar la inhibición de la absorción de agua y sal en la porción gruesa del asa y en los túbulos colectores (Hao y Breyer, 2008; Smyth y cols., 2012).

2.5.3 Contribución de las COXs a la patogénesis de la HTA.

La COX-1 y la COX-2 intervienen en la regulación de la presión arterial normal y en patologías como la hipertensión arterial, mediante la producción de prostanoideos vasoconstrictores y vasodilatadores que regulan la función cardiovascular y que participan en la regulación de la concentración de iones y del volumen de agua (Ye y cols., 2006). Se ha observado que la COX-1 y la COX-2 pueden tener diferentes efectos sobre la presión sanguínea dependiendo el tipo de prostanoide al que se encuentren asociadas, en este sentido, la inhibición de la COX-2 aumenta el efecto presor de la administración aguda de Ang II y el flujo sanguíneo medular renal en ratas anestesiadas, mientras que la inhibición de la COX-1 atenúa la hipertensión arterial en este modelo (Qi y cols., 2002).

La inhibición crónica de COX-2 en un modelo de ablación renal en ratas disminuyó la proteinuria e inhibió el desarrollo de glomerulosclerosis (Wang y cols., 2000), mientras que en un modelo de

nefrectomía parcial, la inhibición selectiva de COX-2 con celecoxib, disminuyó el daño renal al observarse disminución de la glomerulosclerosis, albuminuria, menor cantidad de infiltración inflamatoria y disminución de la expresión ectópica de COX-2 en el intersticio de la corteza, intraglomerular y en la vasculatura, además de la mácula densa (Fujihara y cols., 2003). En un estudio realizado en un modelo de diabetes e hipertensión, se encontró incremento en la expresión de COX-2 y se observó que la administración crónica de un inhibidor selectivo de COX-2 disminuyó la proteinuria y la formación de matriz extracelular, además se observó disminución de la expresión de mediadores de daño glomerular y tubular como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β), PAI-1 y VEGF (Cheng HF y cols., 2002).

En un estudio en el que se utilizó un modelo de hipertensión renovascular dos riñones/un clip (2K1C) en ratas, se encontró que la inhibición de la actividad COX-2 con celecoxib, disminuyó la fibrosis intersticial en el riñón (Richter y cols., 2004). La sobre expresión de COX-2 además puede predisponer a daño en los podocitos glomerulares renales de ratones transgénicos que sobreexpresan COX-2, ya que presentan albuminuria, disminución en el tamaño de los pedicelos y disminución de la proteína estructural nefrina. En los podocitos el receptor EP4 de la PGE₂ es el subtipo de receptor principal y se cree que es esta prostaglandina es la que provoca la disociación de las fibras de actina y alteraciones en los pedicelos (Cheng y cols., 2007).

También se ha estudiado el papel de los prostanoides, en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, como infarto agudo al miocardio, aterosclerosis y la misma hipertensión arterial (Yuhki y cols., 2011; Félétou y cols., 2011; Tang y Vahoutte, 2008). Se ha descrito que la PGE₂ contribuye a la regulación de la presión arterial a través de modular el flujo sanguíneo, la excreción de sodio y la reabsorción de agua, así como intervenir en la regulación del SRA (Swan y Breyer, 2011; Yang T, 2007; Jia y cols., 2006). EL TXA₂ es un potente vasoconstrictor y se observó que la delección del gen para este prostanoides ocasiona la disminución del efecto presor ocasionado por Ang II, proponiendo que participa en su mecanismo de regulación (Francois y cols., 2004). La PGI₂ por otro lado es un potente vasodilatador producido por las células endoteliales vasculares en donde participa en la regulación de la presión arterial sistémica (Yuhki y cols., 2011; Smyth y cols., 2012;

Félétoú y cols., 2011), así como interviene a nivel renal regulando la secreción de renina y la concentración de sales en la médula (Yu y cols., 2010).

2.6 Sistema renina-angiotensina (SRA).

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un importante regulador de la presión arterial sistémica y renal al intervenir en el balance de sodio, del volumen del fluido extracelular y las resistencias vasculares renal y sistémica, por lo que participa de manera importante en la fisiopatología de la hipertensión, la insuficiencia cardiaca congestiva, el infarto del miocardio y la nefropatía diabética (Kobori y cols., 2007; Crowley y Coffman, 2012).

En la vía clásica del SRA, la enzima limitante del sistema, la renina cataliza la conversión de su sustrato el angiotensinógeno, para liberar un péptido de 10 aminoácidos: la angiotensina I (Ang I) que tiene un efecto vasoconstrictor leve. Posteriormente, por hidrólisis se pierden dos aminoácidos más de esta molécula, para formar el péptido de 8 aminoácidos, la angiotensina II (Ang II). Esta conversión se produce casi totalmente en los pulmones, catalizada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente en el endotelio de los vasos pulmonares (Castrop y cols., 2008).

La Ang II es el principal efector del SRA, ya que es una sustancia vasoconstrictora muy potente, que al unirse a su receptor AT₁ puede elevar la presión arterial mediante diferentes mecanismos. A continuación, se describen brevemente los principales componentes del SRA.

2.6.1 Componentes del SRA.

La renina es una glicoproteína de 340 aminoácidos, se sintetiza como preproenzima de 406 aminoácidos que se procesa intracelularmente para convertirse en prorenina, una forma madura pero inactiva de la enzima, se deben eliminar 43 aminoácidos de su región aminoterminal para producir renina activa.

La renina es una proteasa de aspartilo que ataca un número restringido de sustratos, el principal es el angiotensinógeno. Esta enzima se sintetiza, se almacena en gránulos y se secreta por exocitosis por las células yuxtglomerulares de las arteriolas aferentes hacia el espacio intravascular y el intersticio que lo rodea. La secreción de renina se regula positivamente por el segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC); sin embargo, a diferencia de la mayoría de las células secretoras, la secreción de renina está inversamente relacionada a las concentraciones intracelulares y extracelulares de calcio (Beierwaltes, 2010).

Existen diferentes mecanismos que regulan la liberación de renina, entre ellos los cambios en el flujo sanguíneo renal, los barorreceptores intrarrenales de la arteriola aferente, alteraciones en la captación de NaCl por la mácula densa regulado por la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ y PGI₂, así como la influencia del sistema simpático sobre las arteriolas del aparato yuxtglomerular (Jackson, 2012).

Las vías que regulan la liberación de renina forman parte de una red fisiológica. Los incrementos de la secreción de renina aumentan la formación de Ang II, misma que estimula a los receptores de angiotensina de tipo 1 (AT₁) en las células yuxtglomerulares para inhibir la liberación de renina. Este sistema de retroalimentación se conoce como mecanismo de retroalimentación negativa de asa corta (Castrop y cols., 2010).

El aumento de la presión arterial bloquean la liberación de renina mediante la activación de barorreceptores de presión alta (lo cual reduce el tono simpático renal), el incremento del tono de los vasos preglomerulares y la reducción de la reabsorción de NaCl en los túbulos proximales (natriuresis por presión), que aumenta la liberación tubular de NaCl hacia la mácula densa. La inhibición de la liberación de renina debido a un incremento de la presión arterial inducidos por Ang II es el mecanismo de retroalimentación negativa de asa larga (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

El angiotensinógeno, el sustrato principal de la renina, es una glicoproteína globular abundante que contiene de 13 a 14% de carbohidratos. En el humano el angiotensinógeno tiene 452 aminoácidos y se sintetiza como preangiotensinógeno, que tiene un péptido señal de 24 a 33 aminoácidos. Este

péptido se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también abundan transcritos de angiotensinógeno en los adipocitos, en ciertas regiones del SNC y en los riñones. El angiotensinógeno se sintetiza y secreta de manera continua en el hígado y su síntesis se estimula por inflamación, insulina, estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea y Ang II (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Al segmentar la región aminoterminal del angiotensinógeno, se obtiene la Ang I.

La ECA es una ectoenzima y una glicoproteína que tiene como sustrato a la Ang I que es convertida por efecto de esta enzima en Ang II. La ECA tiene un peso molecular de 170 000 daltones, en los seres humanos contiene 1277 aminoácidos y posee dos dominios homólogos, cada uno con un sitio catalítico y una región para unirse al zinc. Posee un gran dominio extracelular aminoterminal, un dominio intracelular carboxilo terminal corto, y una zona hidrófoba de 17 aminoácidos que fija a la ectoenzima en la membrana celular (Crowley y Coffman 2012).

La ECA circulante representa la enzima de la membrana que se liberó por proteólisis por efecto de una secretasa y se ha desprendido. La enzima libre es inespecífica e hidroliza unidades de sustratos con diversas secuencias de aminoácidos, los sustratos preferidos sólo tienen un grupo carboxilo libre en el carboxilo terminal y la prolina no debe ser el penúltimo aminoácido; por lo que la Ang II no es sustrato de la ECA. Si bien en el plasma puede ocurrir la conversión lenta de angiotensina I en Ang II, el metabolismo muy rápido que ocurre *in vivo* se debe en gran parte a la actividad de la ECA unida a la membrana, presente en la cara luminal de células endoteliales de todo el sistema vascular (Jackson, 2012).

Existe una segunda isoforma de la ECA, la ECA-2; esta carboxipeptidasa fue descubierta por dos grupos de estudio de manera independiente. La ECA-2 del ser humano tiene 805 aminoácidos con una posible secuencia señal corta. Contiene un dominio catalítico aislado que es 42% idéntico a los dos dominios catalíticos de la ECA. La ECA-2 segmenta la angiotensina I en angiotensina (1-9), y procesa la Ang II en la angiotensina (1-7). En animales, se observa que una expresión reducida de ECA2 se acompaña de hipertensión y defectos en la contractilidad cardíaca (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Existen otros péptidos de angiotensina además de la angiotensina I y II, con efectos fisiológicos. La angiotensina III también denominada angiotensina (2-8), puede formarse por efecto de la aminopeptidasa sobre la Ang II o por la ECA sobre la [des-Asp1] angiotensina I. Las angiotensinas II y III causan efectos cualitativamente similares, la angiotensina III es casi igual de potente que la II en la estimulación de la secreción de aldosterona; sin embargo, sólo tiene 10 y 25% de la potencia de la II para aumentar la presión arterial y estimular la médula suprarrenal, respectivamente (Fleming y cols., 2006).

La angiotensina (1-7) libera vasopresina, estimula la biosíntesis de prostaglandinas, produce respuestas depresoras cuando se inyecta en ciertos núcleos del tallo encefálico, dilata algunos vasos sanguíneos y ejerce una acción natriurética en los riñones. La angiotensina (1-7) también inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular y se ha propuesto que la angiotensina (1-7) sirve para contrarrestar o equilibrar las acciones de la Ang II (Ferrario y cols., 1997).

La angiotensina (3-8), también denominada angiotensina IV, es otro péptido de angiotensina activo biológicamente. En varios tejidos se detectan posibles receptores de angiotensina (3-8), y el péptido estimula la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) en células endoteliales y tubulares proximales, aunque en las células del músculo liso vascular y en los cardiomiocitos es la Ang II la que interviene en el aumento de la expresión del PAI-1. La angiotensina (3-8) también puede participar en la adquisición de la memoria e igual que la angiotensina (1-7), al parecer contrarresta los efectos de la Ang II (Jackson, 2012).

La angiotensina (1-7) se forma por múltiples vías: al metabolizarse la angiotensina I por la metalopeptidasa 24.15, la endopeptidasa 24.11 y la prolilendopeptidasa 24.26, también se puede formar a partir de la conversión de la Ang II por la prolilcarboxipeptidasa (Ferrario y cols., 1997).

Los efectos de la Ang II se ejercen a través de receptores hepta helicoidales específicos acoplados a proteínas G. Los dos receptores de Ang II son los receptores AT₁ y AT₂. El receptor AT₁ tiene 359 aminoácidos y el receptor AT₂ tiene 363 aminoácidos y tienen poca homología de secuencia. Casi todos los efectos biológicos conocidos de la Ang II son mediados por el receptor AT₁, aún no se

definen bien las actividades funcionales de los receptores AT₂, pero es posible que ejerzan efectos antiproliferativo, proapoptótico, vasodilatador y antihipertensor (de Gasparo y cols., 2000).

Es posible que los efectos complejos de la activación del receptor AT₂ en el tono y la biología vasculares dependan de factores como especie, órgano y diámetro vascular. Aunque al receptor AT₂ se le considera como protector cardiovascular, su activación puede contribuir a la fibrosis cardiaca. El receptor AT₂ está ampliamente distribuido en tejidos fetales, pero tal distribución es muy limitada en los adultos, en los que algunos tejidos contienen receptores AT₁ o AT₂ en tanto que otros contienen receptores en cantidades semejantes (Siragy, 2000).

Los receptores AT₁ activan diferentes sistemas de transducción de señales para producir efectos que varían con el tipo de célula y que son una combinación de respuestas primarias y secundarias. Estos receptores se acoplan a varias proteínas G heterotriméricas, incluyendo G_{α12/13} y G_i aunque en casi todos los tipos de células se acoplan a G_{αq/11} para activar fosfolipasas como la A, la D y la C (PLC), esta última genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol que activa a la proteína cinasa C que a su vez fosforila diferentes proteínas que participan en acciones como son la contracción del músculo liso y la secreción de aldosterona, así como el crecimiento y la proliferación celular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Fleming y cols., 2006; Siragy, 2000).

La unión de la Ang II a su receptor AT₁ también activa endocitosis e internalización del complejo Ang II-AT₁ a compartimentos intracelulares, el que una vez internalizado, estimula el incremento de calcio intracelular y activa al NF-κB, que además de estar implicado en inflamación y regular negativamente la expresión de la COX-2 (Cheng y cols., 1999), participa en la inmunidad, proliferación celular, apoptosis, lleva a incremento en la expresión del intercambiador de sodio-hidrógeno (NHE-3) y factores de crecimiento (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La Ang II incrementa de manera directa la contractilidad cardiaca por medio de la apertura de los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje en miocitos cardiacos y de manera indirecta la frecuencia cardiaca al favorecer el tono simpático, la neurotransmisión adrenérgica y liberación de catecolaminas suprarrenales; el incremento rápido de la presión arterial activa un reflejo barorreceptor que

disminuye el tono simpático y aumenta el tono vagal. Así la Ang II puede incrementar, disminuir o no cambiar la contractilidad, la frecuencia y el gasto cardiaco, dependiendo del estado fisiológico (Jackson, 2012).

2.6.2 Participación del SRA en alteraciones renales por la HTA.

La activación de la SRA es uno de los factores más importantes en la progresión de la insuficiencia renal crónica, su efecto no sólo es aumentar la presión arterial elevada, sino también, la promoción de la proliferación celular, la inflamación y la acumulación de matriz extracelular. La Ang II a través de su receptor AT_1 causa hipertrofia, estimula la proliferación de células mesangiales, induce la expresión de TGF- β_1 con lo cual afecta los procesos de proliferación, apoptosis y síntesis de colágena (Efrati y cols., 2007), se ha demostrado que disminuir la producción de Ang II mediante la administración de Vitamina D con inhibidores de la ECA suprime la expresión de matriz extracelular, la inflamación intersticial y la activación de miofibroblastos (Li y Batuman 2009).

La Ang II estimula la liberación de ET-1, la cual además de ser un potente vasoconstrictor, también ejerce acciones proinflamatorias autocrinas, paracrinas, mitogénicas y profibróticas. La ET-1 produce efectos biológicos relevantes como vasoconstricción medular y cortical, contracción mesangial, así como sobreproducción de matriz extracelular. Además la ET-1 es capaz de activar y mantener la inflamación y la fibrosis al interactuar con el factor de crecimiento tisular renal beta y por activar a NF- κ B. Por lo tanto ET-1 parece tener un papel importante en el daño renal agudo al intervenir en el proceso isquémico, así como en la disminución del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (Mennuni y cols., 2014).

Los efectos no hemodinámicos de la Ang II implicados en la patogénesis de la enfermedad renal crónica hipertensiva incluyen su participación como un potente agente proinflamatorio, capaz de modular respuestas inmunes e inflamatorias en células endoteliales y de músculo liso, así como la quimiotaxis, la proliferación celular y la diferenciación de monocitos a macrófagos (Gurley y cols., 2011).

Otro de los mecanismos en los que la Ang II participa en el daño renal es a través de estimular la producción de ROS por inducción de la NADPH oxidasa vascular. Las ROS son producidas en las arteriolas, las células glomerulares y tubulares, la mácula densa y los podocitos (Mennuni y cols., 2014). La activación de la producción de ROS en células de músculo liso, y endoteliales vasculares desencadena señalización redox que activa la inflamación y activación de factores de la transcripción como el NF- κ B que inducen fibrosis renal (Richter y Kietzmann, 2016). Además las ROS son potentes moduladores de la contracción y dilatación vascular, así como de la disponibilidad de NO y ocasionan peroxidación lipídica (Touyz y Briones, 2011).

Otro componente del SRA implicado en el daño inflamatorio y fibrótico es la aldosterona, la cual induce glomeruloesclerosis por diferentes mecanismos, incluyendo una acción pro-oxidante dependiente de NADPH oxidasa, activación de NF- κ B y potenciando la actividad mitogénica de TGF- β (Crowley y Coffman, 2012; Macconi y cols., 2014).

2.7 Modelo de ratas espontáneamente hipertensas.

El modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés), ha sido ampliamente estudiado, entre otras razones porque permite estudiar diferentes etapas en el desarrollo de la hipertensión arterial.

La cepa SHR, fue obtenida durante los años 60's por Okamoto y colegas por reproducción selectiva de ratas Wistar Kyoto (WKY) con elevada presión sanguínea (Grollman, 1972). Al igual que en los humanos, la hipertensión en las SHR se presenta con la edad y al ser de tipo primaria la causa es desconocida. En las SHR la presión sanguínea se empieza a elevar alrededor de las 7-9 semanas de edad y la presión arterial sistólica alcanza valores entre los 180-200 mmHg en el adulto (Kundu y Rao, 2008).

2.7.1 Alteraciones morfo-funcionales en SHR.

En ratas SHR jóvenes de 4 semanas de edad la función renal se encontró alterada, con disminución en el peso del riñón en comparación a WKY de la misma edad. Las alteraciones renales en esta edad también incluyeron incremento en la resistencia vascular renal y disminución de la tasa de filtración glomerular a las 4 y 5 semanas de edad, ocasionando hipervolemia que contribuye a aumentar la resistencia renal periférica y en consecuencia la hipertensión arterial (Uyehara y Gellai, 1993; Hinojos y Doris, 2014).

A las 4 semanas de edad se encontró en las SHR un ligero decremento en el número de glomérulos y en el diámetro glomerular renal, también se observó fibrosis túbulo-intersticial, que se exacerba a las 8 semanas de edad. A nivel de microscopia electrónica a las 4 semanas de edad se observó ensanchamiento en las crestas mitocondriales de las células de los túbulos renales, mientras que a las 8 semanas de edad se observó desorganización de los túbulos corticales y células vacuoladas (Mazzei y cols., 2016).

También se ha descrito la retención de sodio y agua en las SHR que puede desencadenar hipervolemia, las causas se relacionan con alteraciones en los transportadores de este ion a nivel de los túbulos proximales. A este respecto se descubrió que hay aumento en la expresión y actividad de la isoforma 3 del cotransportador Na^+/H^+ (NHE3) en las microvellosidades del borde en cepillo de las células del túbulo proximal renal de SHR de 5 semanas de edad (LaPointe y cols., 2002; Crajoinas y cols., 2010). En otro estudio realizado en SHR de 4 semanas de edad se encontraron además alteraciones en la, distribución subcelular, fosforilación y abundancia de las subunidades en la bomba Na^+/K^+ ATPasa en las mismas células (Hinojos y Doris, 2014). En concordancia con los estudios mencionados, se observó incrementada la tasa de consumo de oxígeno comparado con la cepa WKY en cultivo primario de células de túbulo proximal de ratas SHR de 3 semanas de edad que corresponde con el incremento del metabolismo oxidativo, el incremento de la función mitocondrial y la producción de ATP en las SHR (Lee y cols., 2014).

Se ha descrito que entre los posibles factores que contribuyen al desarrollo de la presión arterial en las SHR, también se encuentra una exagerada respuesta del sistema nervioso autónomo (SNA) que se presenta desde etapas previas al desarrollo de la hipertensión arterial. A este respecto se propuso que la sobreexpresión en cuerpos carotídeos de los canales no dependientes de voltaje ASIC y TASK sensibles a ácido, ocasionan el incremento de la resistencia vascular en la cepa SHR y se sugiere además que este aumento contribuye a cambios estructurales propios de la hipertensión (Tan y cols., 2010).

Aunado a lo anterior existe evidencia de la desregulación en la señalización adrenérgica cardíaca. Las alteraciones en la recaptura de norepinefrina y el aumento en el tránsito de calcio neuronal que se traducen en incremento en la liberación de dicho neurotransmisor además de una leve taquicardia en reposo e incremento en el gasto cardíaco previo al desarrollo de la hipertensión en SHR (Shanks y cols., 2013). A este respecto también se han reportado en SHR de 6 semanas de edad alteraciones en la biosíntesis y secreción de importantes catecolaminas reguladoras del gasto cardíaco y de la función vascular como dopamina, epinefrina y norepinefrina en las glándulas suprarrenales. La disminución en la expresión de los genes que sintetizan catecolaminas es temporalmente independiente del desarrollo de la hipertensión, pero puede contribuir a la patogénesis de esta patología posiblemente por regulación de mecanismos nerviosos centrales, ya que las catecolaminas ejercen acciones vasodepresoras en el tallo cerebral (Jirout y cols. 2010).

Se demostró también que el sistema renina angiotensina (SRA), se encuentra sobreactivado desde etapas prehipertensivas, al presentarse aumento del vasoconstrictor Ang II (Castro-Moreno y cols., 2012; Correa y cols., 1995) y de su receptor AT₁ en túbulo proximal renal en SHR de 4 semanas de edad (Cheng y cols., 1998), por lo que el aumento de la actividad del SRA puede estar contribuyendo a las alteraciones renales que se observan a esta edad.

Existe evidencia que la disminución en la actividad del receptor PPAR γ en las SHR se asocia con alteraciones en la regulación de la vasculatura renal, dicho receptor interviene en la regulación del metabolismo de lípidos, en señalización celular, la producción del vasodilatador óxido nítrico (NO), de las ROS y la inducción de la expresión de la COX-2 (Martin y cols., 2012), de esta manera se

encontró que el tratamiento de SHR de 5 semanas de edad con un agonista de PPAR γ retarda el aumento de la presión arterial, mejora el perfil lipídico y la función de la vasculatura (Dovinova y cols., 2013).

Mediante la técnica de TUNEL se encontró un mayor número de células en apoptosis presentes en el epitelio tubular de las SHR a las 8 semanas de edad (Mazzei y cols., 2016). Se postula que alteraciones a nivel del desarrollo embriológico del riñón son un importante factor de riesgo para la enfermedad renal; ya que puede condicionar a una progresión más rápida de la HTA. Las alteraciones embrionarias genéticas, así como epigenéticas pudieron generar cambios en la expresión de genes reguladores como el factor de la transcripción de tumor de Wilm (WT₁) que está disminuido en SHR de 4 semanas de edad (Mazzei y cols., 2016). WT₁ tiene un papel primordial durante el desarrollo del riñón en la proliferación y diferenciación celular (Menke y Shedl, 2003), así como en el mantenimiento de la función normal de este órgano en la vida posnatal, ya que regula la expresión de proteínas importantes como la renina implicada en la regulación de la presión arterial (Steege y cols., 2008).

3. Objetivo General.

Evaluar la participación de COX-2 y del SRA en las alteraciones morfológicas y funcionales a nivel renal durante el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial primaria.

3.1 Objetivos particulares.

- Determinar en el riñón de ratas WKY Y SHR de 6 semanas de edad la presencia de cambios en el tamaño de los glomerulos y de los vasos sanguíneos, la presencia de fibrosis y a nivel ultraestructural cambios en el grosor de la membrana basal glomerular
- Identificar diferencias en la localización de la proteína de COX-2, renina y PRR en la corteza renal de SHR y WKY.
- Evaluar cambios en la expresión proteica de COX-2 y renina en la coreza renal de SHR y WKY.
- Medir los niveles séricos de Ang II y Ang (1-7) y de los marcadores urea y creatinina de ratas WKY y SHR.
- Determinar en riñón de ratas WKY y SHR, el efecto del tratamiento por 8 semanas con el inhibidor selectivo de COX-2 (celecoxib) y el inhibidor de la ECA (captopril) sobre el tamaño de los glomérulos y a nivel ultra estructurales diferencias en el grosor de la membrana basal glomerular en la corteza renal.

4. ANTECEDENTES.

La participación de las COXs y los prostanoideos en las alteraciones renales asociadas a la HTA se han estudiado en diferentes modelos animales. Se reportó en un modelo de ablación renal en ratas, que la inhibición crónica de COX-2 disminuyó la proteinuria e inhibió el desarrollo de glomerulosclerosis (Wang y cols., 2000), mientras que en un modelo de nefrectomía parcial, la inhibición selectiva de COX-2 con celecoxib, disminuyó el daño renal al observarse menor glomerulosclerosis, albuminuria, infiltración de células inflamatorias y disminución de la expresión ectópica de COX-2 en el intersticio de la corteza, intraglomerular y en la vasculatura, además de la mácula densa (Fujihara y cols., 2003). En un estudio de diabetes e hipertensión, se encontró incremento en la expresión de COX-2 y se observó que la administración crónica de un inhibidor selectivo de COX-2 disminuyó la proteinuria y la formación de matriz extracelular, además disminuyó la expresión de mediadores de daño glomerular y tubular como TGF- β , PAI-1 y VEGF (Cheng HF y cols., 2002). En un estudio en el que se utilizó un modelo de hipertensión renovascular 2K1C en ratas, se encontró que la inhibición de la actividad enzimática de COX-2 con celecoxib, disminuyó la fibrosis intersticial en el riñón (Richter y cols., 2004).

La sobreexpresión de COX-2 además puede predisponer a daño en los podocitos glomerulares renales de ratones transgénicos, que presentan albuminuria, disminución en el tamaño de los pedicelos y disminución de la proteína estructural nefrina, se sabe que en los podocitos el receptor EP4 de la PGE₂ es el subtipo de receptor principal y se cree que es esta prostaglandina la que provoca la disociación de la fibras de actina y alteraciones en los pedicelos (Cheng y cols., 2007). Por otra parte en cultivos primarios de células mesangiales se demostró que el mismo receptor participaba en el daño glomerular al aumentar la expresión de colágena tipo I y fibronectina inducidas por TGF- β , Asimismo se describió un mecanismo de regulación positiva en el que la activación de este receptor estimulaba en las células mesangiales la expresión de COX-2 y de la PGE₂ (Yang y cols. 2004).

Por otro lado, en otros modelos animales se observó que la inhibición no selectiva de COX por la administración de AINEs disminuyó la presión sanguínea en humanos y animales con estenosis

arterial renal (Wang y cols., 1999). Por otro lado, la coartación aórtica incrementa la expresión de COX-2 en la mácula densa y en la porción gruesa ascendente del asa de Henle y la inhibición de COX-2 reduce la actividad de renina y la presión sanguínea en este modelo de hipertensión vascular renal (Wang y cols., 1999).

También existe evidencia de la participación del SRA en el daño renal. La inhibición del receptor de angiotensina AT₁ revirtió las alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con la función e integridad de los podocitos y la proteinuria en un modelo de estudio por sobre expresión genética de renina (Huby y cols., 2009). En un modelo de hipertensión maligna, se describió aumento de la actividad de renina intrarrenal, que escapaba de los mecanismos de regulación normales lo que ocasionaba aumento de los niveles de Ang II, de la presión intraglomerular y de la apoptosis en células mesangiales (Efratti y cols., 2007).

Se demostró que la inhibición directa de renina con el fármaco aliskireno disminuyó la albuminuria, la citosina inflamatoria TNF- α y la proteína C reactiva (un indicador de inflamación), así como proteínas del complemento en un modelo transgénico de hipertensión en ratas inducida por sobre activación del SRA (Müller y Luft, 2006). Por otra parte la Ang II, además de su función como vasoconstrictor también induce la proliferación celular, la hipertrofia, la generación de ROS, la inflamación y la estimulación de la producción de matriz extracelular a través de la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y promueve el cambio de fenotipo de fibroblasto a miofibroblasto, células que proliferan en espacios periglomerulares y peritubulares (Rüster y Wolf, 2006).

Diversos estudios han demostrado además la relación entre la COX-2 y el SRA. Los prostanoideos producidos por COX-2 en células de la mácula densa pueden estimular el SRA al inducir la liberación de renina en las células yuxtglomerulares vecinas (Cheng y cols., 2001; Harris y cols., 2004). A su vez la Ang II ejerce un mecanismo de regulación negativa sobre la expresión de COX-2, mientras que la activación del receptor de renina prorrenina (PRR) a través de la activación de vías de señalización del tipo MAPK como ERK $\frac{1}{2}$ y p38 estimulan la sobreexpresión de COX-2 y de proteínas de matriz extracelular en células mesangiales (Nguyen y Müller, 2010; Huang y cols., 2006 y Kaneshiro y cols., 2006).

5. METODOLOGÍA

5.1 Material Biológico.

Ratas WKY y SHR fueron mantenidas en condiciones estándar de luz y oscuridad con alimento y agua *ad libitum*. Se evaluaron dos etapas (prehipertensa e hipertensa) y los grupos se dividieron como se observa en la siguiente tabla:

Etapa	Grupo	Número de animales	Edad inicial (sem)	Edad término (sem)
Prehipertensa	WKY	6	4	6
	SHR	6	4	6
Hipertensa	WKY	6	4	12
	WKY + celecoxib	6	4	12
	WKY + captopril	6	4	12
	SHR	6	4	12
	SHR + celecoxib	6	4	12
	SHR + captopril	6	4	12

Los procedimientos empleados en este proyecto se ajustaron a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.2 Administración del tratamiento farmacológico.

En la segunda parte del proyecto, se evaluaron los tres grupos de ratas WKY y SHR, los cuales recibieron en el agua de beber uno de los siguientes tratamientos a partir de la semana 4 y hasta la

semana 12 de edad: celecoxib (1mg/Kg de peso por día), captopril (30 mg/Kg de peso por día) y el grupo control recibió el vehículo.

A estos grupos se les midió la presión arterial y para evaluar cambios morfológicos se midió el tamaño de los glomérulos y el grosor de la membrana basal glomerular.

5.3 Medición de la presión arterial.

A todos los animales se les determinó la presión arterial sistólica en estado consciente y por triplicado por pletismografía no invasiva (*Automatic blood pressure computer*, LEICA, PanLab, España).

Este parámetro se evaluó desde la semana 4 de edad y durante cada semana hasta el día que se les dio muerte a los animales de acuerdo a la técnica descrita por De Abril Ruíz-Leyja y cols, (2013).

La técnica consistió en colocar a los animales en un cepo para restringir su movimiento y colocarlos en una cámara a 37°C, posteriormente se les colocó un manguito de oclusión en la arteria caudal y un transductor de presión para registrar la presión arterial sistólica y diastólica al desinflarse el anillo del manguito de látex. El promedio de cuatro mediciones fue utilizado para registrar los niveles de presión arterial para cada rata.

5.4 Eutanasia de los animales y disección del tejido renal.

Una vez llegada la edad o concluido el tratamiento se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso), se tomó una muestra sanguínea de la aorta con heparina como anticoagulante.

Posteriormente se realizó una laparotomía para exponer la cavidad abdominal y colocar una cánula a través de la arteria aorta para hacer circular amortiguador de fosfatos (PBS) a 4°C hacia los riñones *in situ* y evaluar que la cánula estuviera colocada correctamente y se retiró la cápsula renal para apartar las glándulas suprarrenales. Posteriormente, se realizó la extracción de los riñones acoplados a la cánula, con ayuda de la cual se acoplaron a una cámara para órgano aislado en donde

fueron perfundidos con PBS por 20 minutos con ayuda de una bomba peristáltica para eliminar completamente la sangre.

5.5 Concentraciones plasmáticas de Angiotensina II y angiotensina (1-7).

Una alícuota de plasma sanguíneo de cada animal fue incubada con inhibidor de proteasas Complete Mini (Roche diagnostics, Mannheim, Alemania) para prevenir la degradación peptídica. El plasma fue limpiado de proteasas con metanol (Sigma Aldrich, Urbana IL, USA) en una proporción de 1:10 y se centrifugó a 16000 x g por 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se agregó 5% de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich, Urbana, IL, USA) para eliminar proteínas, se mezcló y se centrifugó a 16000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de poro y se diluyó con 0.1 M de NaOH, posteriormente la muestra (2 ml) se pasó a través de un cartucho Sep-Pak clásico C-18 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Un volumen de 100 µl de la muestra final filtrada se utilizó para el análisis.

La angiotensina II y la angiotensina 1-7 se detectaron y cuantificaron simultáneamente por electroforesis capilar en zona con detección de UV por una matriz de fotodiodos a una longitud de onda de 200 nm. El análisis se realizó usando un sistema P/ACE MDQ acoplado a un sistema de detección UV-PDA (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) controlado por un software 32 Karat versión 7.0 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Las concentraciones de angiotensina II y angiotensina 1-7 se determinaron por medio de curvas estándar.

5.6 Técnica histológica.

Una vez disecados los riñones, se cortaron de manera longitudinal y se sometieron al proceso de fijación en paraformaldehído al 4% p/v en PBS. Posteriormente el tejido fue procesado con técnica histológica de rutina deshidratando en soluciones de etanol en concentraciones ascendentes hasta sumergirlo en etanol absoluto y xilol para finalmente incluir cada tejido en parafina. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 4 µm de grosor en un microtómo (Leica, Wetzlar, Alemania) y se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina.

5.7 Tinciones histológicas.

Los cortes histológicos fueron teñidos con la tinción general hematoxilina y eosina para evaluar el tamaño de los glomérulos.

Para evaluar la presencia de fibrosis se realizaron las tinciones especiales tricrómica de Masson que permite evaluar el aumento de colágena (que se identifica con una coloración azul) y la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) que tiñe carbohidratos de color magenta (en el riñón la membrana basal glomerular es rica en carbohidratos por lo que el incremento en la presencia del color magenta con la tinción de PAS indica mayor expresión en las proteínas de matriz extracelular que componen esta estructura). Para detalles de la técnica ver el apéndice II.

5.8 Evaluación de la ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión.

Fragmentos de tejido renal de 1mm³ se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% con glutaraldehído 2.5% en PBS por 90 minutos, se procesaron por técnica de rutina y se incluyeron en resina epóxica EPON 812 y polimerizaron a 60°C por 24 horas. Para detalles de la técnica ver el apéndice II.

Se realizaron cortes semifinos y se tiñeron con azul de toluidina al 1% para observar en microscopio óptico y cortes ultrafinos que se montaron en rejillas de cobre cubiertas con película de formvar, contrastadas con acetato de uranilo acuoso al 4% y citrato de plomo al 0.35% durante 20 minutos y 10 minutos respectivamente y se capturaron imágenes de los glomérulos en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 (Tokyo, Japón), para evaluar el grosor de la membrana basal del glomérulo y otras alteraciones ultraestructurales como el cambio en la estructura de los pedicelos.

5.9 Inmunohistoquímica de COX-2 y renina.

Para identificar cambios en la localización de la expresión de la proteína de COX-2 y renina, se identificó la presencia de la proteína de dichas enzimas mediante la técnica de inmunohistoquímica

en cortes histológicos de riñón, en la cual se emplearon anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos. Para detalles de la técnica ver apéndice II.

La visualización y la captura de las imágenes se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss), se evaluaron 50 campos por riñón de 4 animales por tratamiento con las mismas condiciones de iluminación y tiempo de exposición para cada muestra a 20X de magnificación.

Con el propósito de evaluar cambios en la cantidad de estructuras positivas para COX-2 el número de glomérulos con mácula densa positiva o el número de túbulos renales positivos en 50 campos al azar con magnificación 20X.

5.10 Inmunohistoquímica del receptor renina prorenina (PRR).

La inmunohistoquímica para detectar la proteína de PRR se realizó por medio de la técnica de detección con diaminobencidina-peroxidasa. Los cortes histológicos se rehidrataron y la recuperación de los antígenos se realizó con la técnica descrita en el apéndice II, posteriormente los cortes de tejido se incubaron con un anticuerpo primario específico anti-PRR o PBS en el caso de los controles negativos y la de la detección se realizó con un kit de detección de acuerdo a las instrucciones del proveedor, los núcleos se contrastaron con hematoxilina. Las microfotografías se capturaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss), con una magnificación de 40x.

5.11 “Western Blot” de renina y COX-2.

La expresión de COX-2 y renina se evaluó con la técnica de “Western Blot”, para lo cual se tomaron 50 miligramos de corteza renal de cada animal y se homogeneizaron en 1 mililitro de solución de RIPA, se cuantificaron las proteínas de las muestras y 100 µg de proteína de cada una fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas por tamaño y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF. Después de bloquear la membrana se incubó toda la noche con anticuerpos específicos y anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos finalmente se capturaron las imágenes en un sistema de detección tipo Odyssey y el

análisis densitométrico de las bandas se realizó con el software Image J (Los detalles de la técnica se encuentran en el apéndice II).

5.12 Análisis estadístico.

En todos los casos, los resultados se analizaron mediante *t de student* o prueba estadística de ANOVA de dos vías, según el caso empleando el software estadístico Sigma Plot versión 11.0.

6. RESULTADOS.

6.1 Evaluación de la presión arterial.

La presión arterial se mantuvo en el rango normal desde la semana 5 hasta la semana 7 en ambas cepas, mientras que la presión de las SHR se incrementó de manera progresiva de la octava a la doceava semana de edad cuando ya se observa presión arterial en el rango de hipertensión arterial (Fig 1).

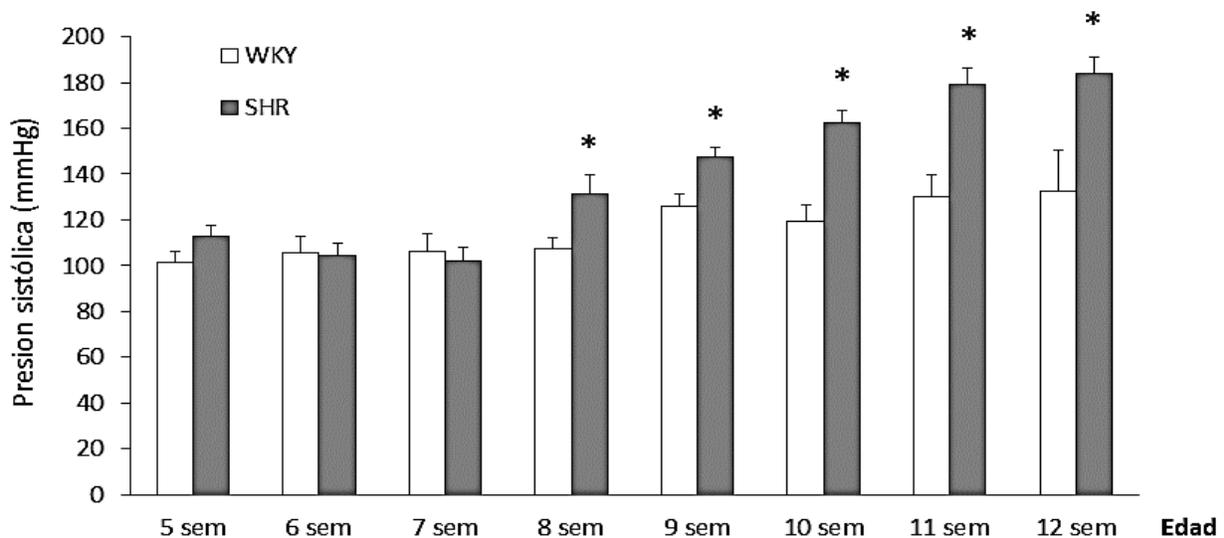


Fig 1. Presión arterial sistólica de ratas WKY y SHR a distintas edades. Se presentan los valores de presión arterial sistólica en milímetros de mercurio (mmHg) de ratas WKY (barras blancas) y SHR (barras gris) desde la semana 5 de edad hasta la semana 12 de edad. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media (sem). $n \geq 6$. * $P < 0.05$ vs WKY.

6.2 Etapa prehipertensa de 6 semanas de edad.

6.2.1 Determinación de las concentraciones plasmáticas de Ang II, Ang (1-7), urea y creatinina.

A las 6 semanas de edad la presión sanguínea de ambas cepas estuvo en el rango normal sin diferencias significativas entre la cepa WKY y la cepa SHR (WKY 107.8 ± 3.8 y SHR 111.8 ± 3.4 mmHg).

En contraste, la frecuencia cardiaca fue significativamente mayor en las ratas prehipertensas SHR que en las ratas WKY (WKY 416.0 ± 6.1 y SHR 458.0 ± 8.0 frecuencia cardiaca, $P < 0.05$).

Para evaluar la actividad de RAS, determinamos la concentración plasmática de angiotensina II y angiotensina (1-7). La concentración de angiotensina II fue significativamente mayor en las SHR prehipertensas que en las ratas WKY, mientras que, la concentración plasmática de angiotensina (1-7) fue significativamente menor en las ratas de la cepa SHR (Fig. 2).

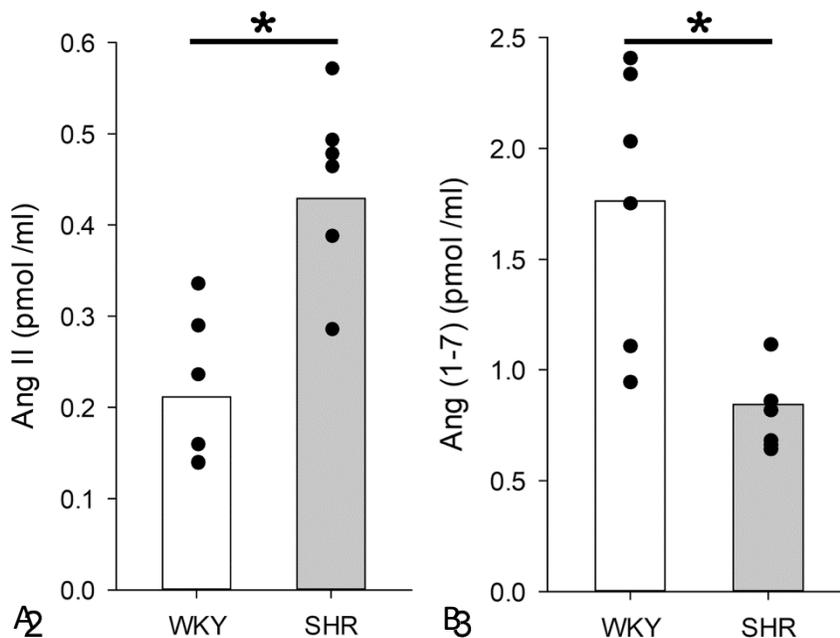


Fig 2. Concentración plasmática de angiotensina II (Ang II) y Ang (1-7) en ratas de la cepa WKY (barras blancas) y ratas espontáneamente hipertensas, SHR (barras grises). (A) La concentración plasmática de Ang II en la cepa SHR fue mayor que en la cepa WKY. (B) La concentración plasmática de Ang (1-7) en la cepa SHR fue menor que la cepa WKY. Las barras representan la media y los puntos de cada dato individual. N=6, * $P < 0.05$ vs WKY.

Para evaluar la función renal determinamos la concentración plasmática de urea y creatinina en ambos grupos. La cepa SHR de 6 semanas de edad prehipertensas no presentó diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de urea (12.4 ± 1.07 mg/dl) comparada con las WKY (13.6 ± 1.46 mg/dl) y tampoco en la concentración plasmática de creatinina en la cepa SHR (0.232 ± 0.029 mg/dl) en comparación con la cepa WKY (0.308 ± 0.55 mg/dl).

6.2.2 Histopatología renal.

En las imágenes de microscopía óptica de la corteza renal de ambas cepas podemos observar corpúsculos renales que aparece como una estructura esferoidal formados por el glomérulo que es un ovillo de capilares rodeados por una estructura de epitelio bilaminar llamada cápsula renal o cápsula de Bowman. También se observan túbulos contorneados proximales que presentan un borde en cepillo que se observa claramente en región apical de las células tubulares con la tinción de PAS con la cual se tiñe de color magenta (Fig 3C y D). En los túbulos contorneados proximales la luz tubular se observa frecuentemente en forma de estrella y presentan un diámetro externo un poco mayor que los tubulos contorneados distales que se observan en menor cantidad en estas micrografías. Los túbulos distales exhiben una superficie luminal más nítida y mejor definida, y además normalmente aparecen menos núcleos en un corte transversal de un túbulo proximal que en un segmento equivalente de un túbulo distal.

En los cortes histológicos observados en este estudio, la corteza renal de las ratas de la cepa WKY se observa sin alteraciones aparentes. En comparación con la cepa WKY, la cepa SHR a las 6 semanas de edad presentó esclerosis difusa en los capilares glomerulares que se presenta como una acumulación de matriz extracelular positiva a la tinción de PAS (flechas) que no se observó en la cepa WKY (Fig 3D), así como una mayor presencia de colágena (flechas) que es una de las principales proteínas de matriz extracelular evidenciada por la tinción tricrómica de Masson (3F). Además la cepa SHR presentó incremento en la proliferación de células mesangiales y engrosamiento de la membrana basal glomerular comparado con la cepa WKY, así como hipertrofia tubular renal e incremento de proteína intra tubular.

Una de las alteraciones mas evidentes en la corteza renal de las SHR prehipertensas de 6 semanas de edad fue una mayor área glomerular en comparación con la cepa WKY que se observa en los cortes histológicos (Fig 3B, D y F) y de manera gráfica (Fig 4).

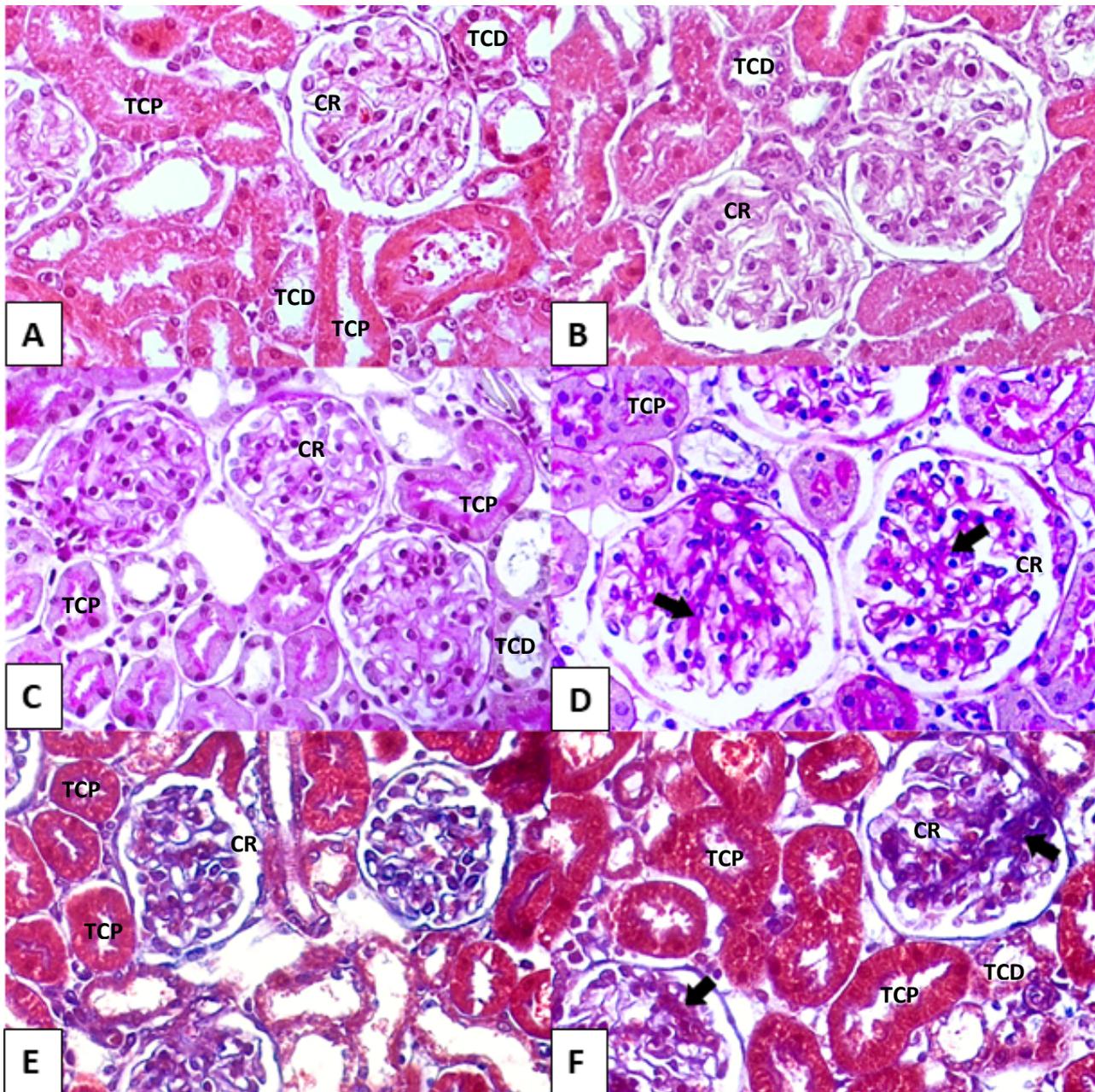


Fig 3. Tinciones H y E, PAS y Masson en cortes histológicos de corteza renal de ratas WKY y SHR. Imágenes de cortes histológicos teñidos con HyE en la cepa WKY (A) y SHR (B) donde se observa hipetrofia glomerular. Imágenes de cortes teñidos con la tinción de PAS en la cepa WKY (C) y SHR (D), en esta cepa se observa aumento de la coloración magenta que característica del incremento de matriz extracelular ó fibrosis (flecha). Imágenes de cortes teñidos con la tinción tricrómica de Masson en la cepa WKY (E) y SHR (F), en la cepa SHR se observa aumento de colágena evidenciado por una coloración azul intensa (flecha). De manera de ejemplo se colocaron abreviaturas en algunas estructuras morfológicas: CR, corpúsculo renal; TCP, túbulo contorneado proximal; TCD, túbulo contorneado distal.

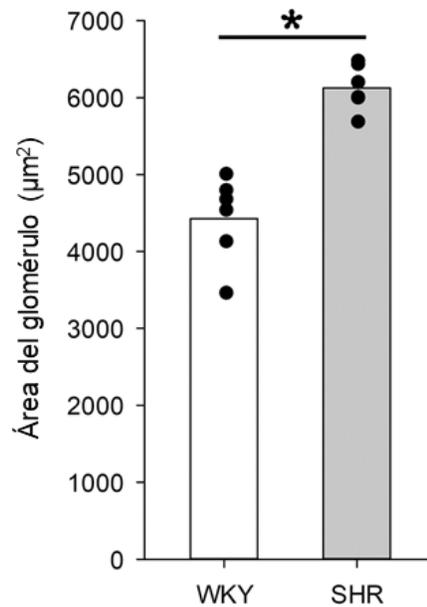


Fig 4. Evaluación del área del glomérulo a las 6 semanas de edad. Las barras representan la media del área glomerular y los puntos de los datos individuales de ratas WKY y SHR de 6 semanas de edad. n=6 *P < 0.05 vs WKY 6sem.

En cuanto a la evaluación morfológica de la vasculatura renal, en los cortes histológicos se observa la morfología característica de las arterias, con la túnica íntima formada por las células endoteliales, la túnica media formada por células musculares lisas y la túnica adventicia formada por tejido conjuntivo.

En las arterias de la cepa WKY, no se observaron modificaciones morfológicas, mientras que en la cepa SHR se presentó un incremento de colágena I en la túnica media y adventicia (flecha) evidenciado por la tinción tricrómica de Masson (Fig 5B), así como por la presencia de fibras reticulares (colágena III) en la pared arterial (Fig 5D).

Uno de los hallazgos mas evidentes presentados en la cepa SHR, fué la disminución en el diámetro luminal de los vasos sanguíneos e hipertrófia de la túnica media (Fig 6), además las arterias de la cepa SHR mostraron remodelación de la elastina.

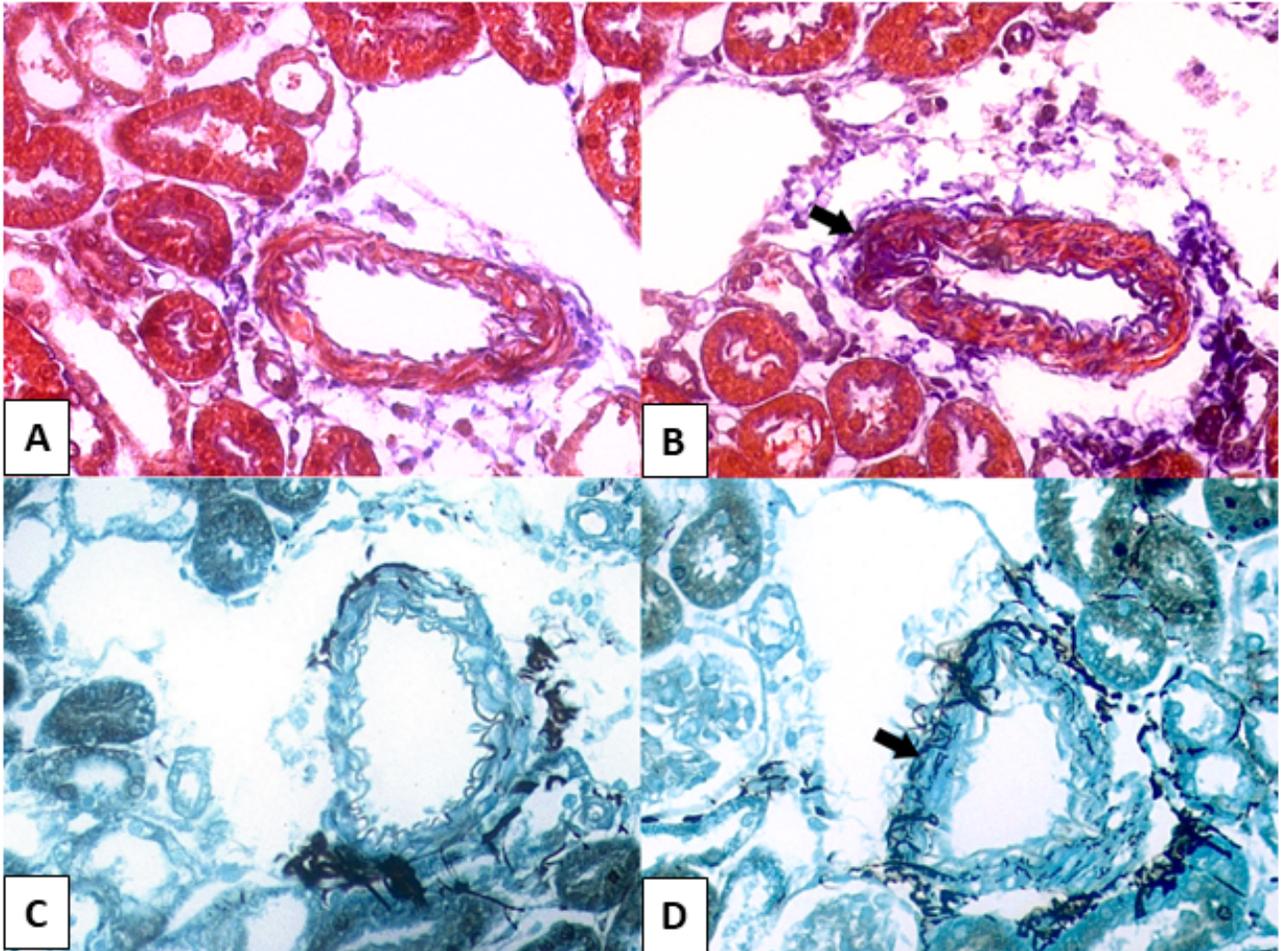


Fig 5. Tinción tricrómica de Masson y fibras reticulares en cortes histológicos de riñón de ratas WKY y SHR. En las imágenes se observan arterias renales de la corteza renal de ratas WKY (A) y SHR (B) de 6 semanas de edad con la tinción tricrómica de Masson donde se observa hipertrofia de la túnica media en la cepa SHR y presencia de fibras de colágena tipo I de color azul (flecha). También se muestran imágenes representativas de arterias renales con la tinción de fibras reticulares (colágena III) que se observan como fibras negras por la tinción de plata, para la cepa WKY (C) y para la cepa SHR (D), donde se observa aumento de este tipo de fibras en la túnica media (flecha).

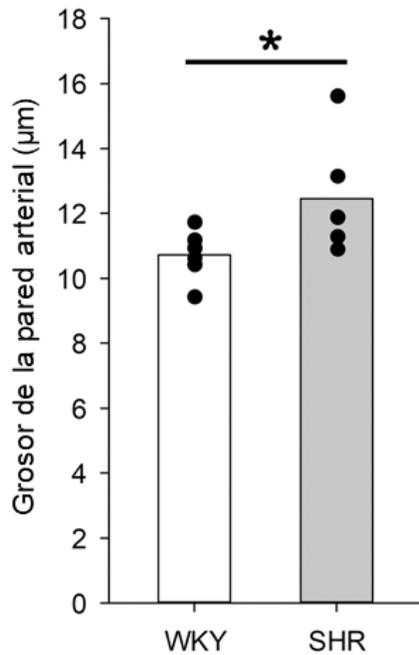


Fig 6. Evaluación del grosor de la pared arterial a las 6 semanas de edad. Las barras representan el promedio del área glomerular de ratas WKY y SHR de 6 semanas de edad. n=6 *P < 0.05 vs WKY 6sem.

6.2.3 Microscopía electrónica.

En las imágenes de la ultraestructura, se observa una porción de los capilares glomerulares renales con un fragmento del aparato de filtración que está compuesto por el endotelio glomerular, la membrana basal glomerular subyacente y la capa visceral de la cápsula de Bowman formada por células denominadas podocitos.

Las células endoteliales de los capilares glomerulares se observan con numerosas fenestraciones lo que le da un aspecto de coladera y en un corte transversal se observan como una línea punteada. La membrana basal glomerular es una lámina gruesa producto de las células del endotelio y de los podocitos y está formada de proteínas de matriz extracelular, proteoglicanos y glucoproteínas. Los podocitos emiten sus evaginaciones alrededor de los capilares glomerulares y en las ultramicrofotografías pueden observarse las prolongaciones de su citoplasma (pedicelos) alrededor de la membrana basal glomerular.

En la cepa WKY la estructura trilaminar de la barrera de filtración glomerular fue normal, con morfología normal de los podocitos y de las fenestraciones de las células endoteliales y ausencia de engrosamiento de la membrana basal glomerular. Sin embargo, la membrana basal glomerular de la cepa SHR estaba engrosada y había regiones con multilaminación, una mínima fusión en los pedicelos de los de los podocitos y disminución de las fenestraciones endoteliales (Fig 7 y Fig 8).

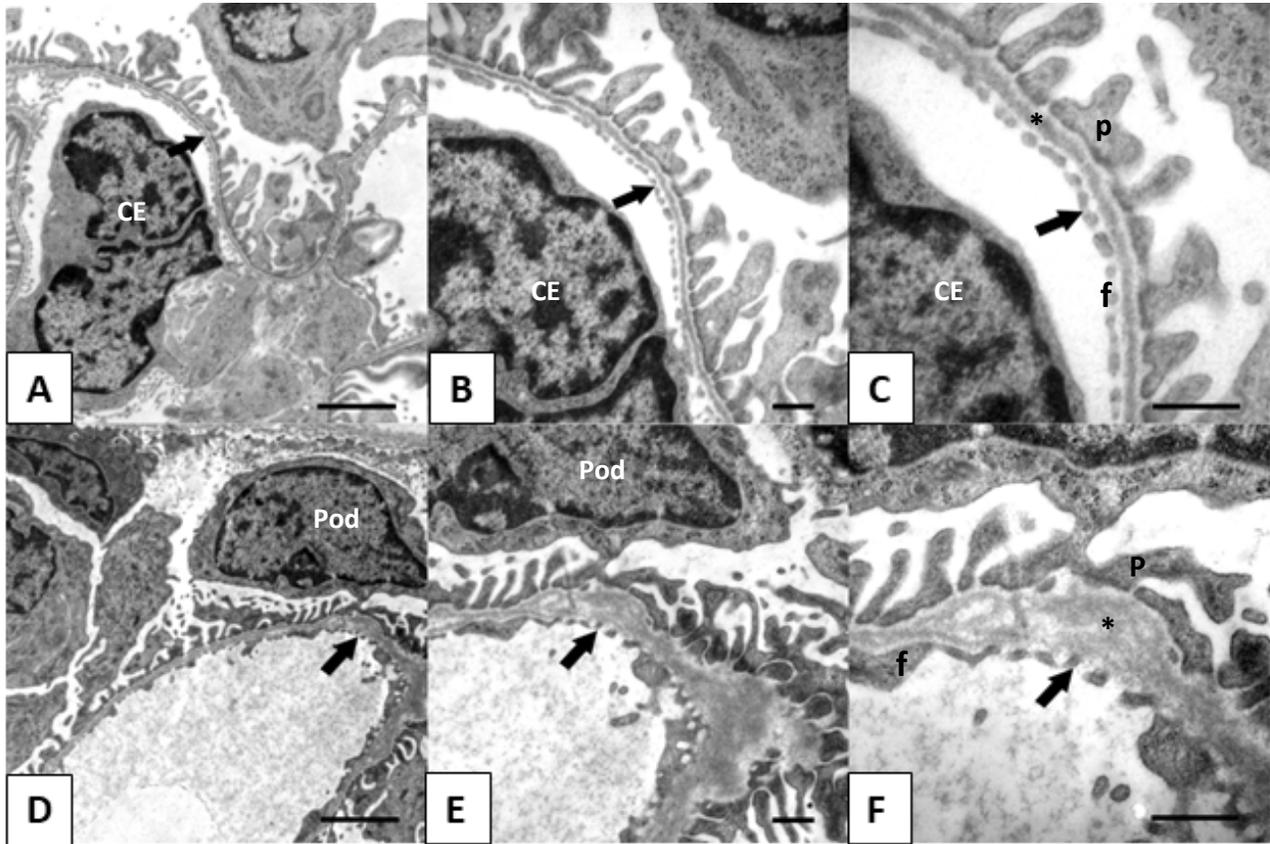


Fig 7. Imágenes ultraestructurales de la membrana basal glomerular de ratas WKY y SHR. Se observan imágenes ultraestructurales de la barrera de filtración de ratas WKY (A,B Y C) y SHR (D,E Y F) de 6 semanas de edad (flechas). Se muestra la estructura normal en la cepa WKY y el engrosamiento de la membrana basal glomerular en la cepa SHR con multilaminación en la membrana basal glomerular. Barra= 2 μ m (A y D), Barra= 500nm (B, C, E y F). CE, célula endotelial; Pod, podocito; p, pedicelo; f, fenestraciones de la célula endotelial; (*) membrana basal glomerular.

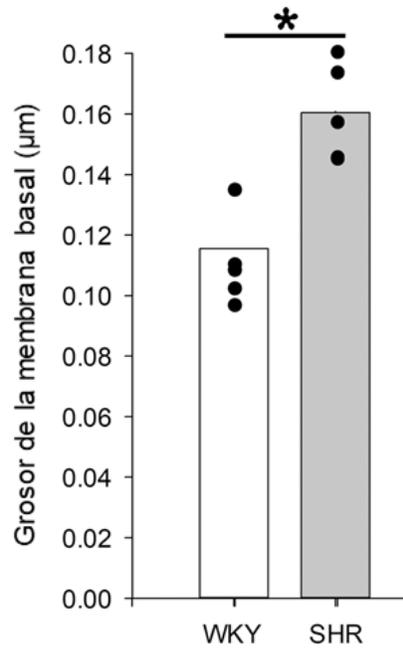


Fig 8. Evaluación del grosor de la membrana basal glomerular. La gráfica representa el promedio del grosor de la membrana basal glomerular y los puntos con los datos individuales de ratas WKY y SHR de 6 semanas de edad. n=6 *P < 0.05 vs WKY.

6.2.4 Inmunolocalización de PRR, renina y COX-2.

Por medio de la técnica de inmunohistoquímica se detectó la proteína de PRR en la corteza renal de las ratas WKY y SHR mediante la coloración café resultado de la reacción enzimática de la peroxidasa presente en los anticuerpos específicos contra dicha proteína (flechas), específicamente en la región apical de las células del epitelio tubular renal de ambas cepas (Fig 9A y B).

Este receptor también se detectó en los glomérulos de las dos cepas (puntas de flecha), sin embargo fue más abundante en la cepa SHR que en la cepa WKY donde se observaba una coloración café mas intensa (Fig 9B).

La proteína de PRR no se detectó en los controles negativos en los cuales solo se colocó el anticuerpo secundario, lo que indica que la señal obtenida no es producto de la unión inespecífica de este anticuerpo.

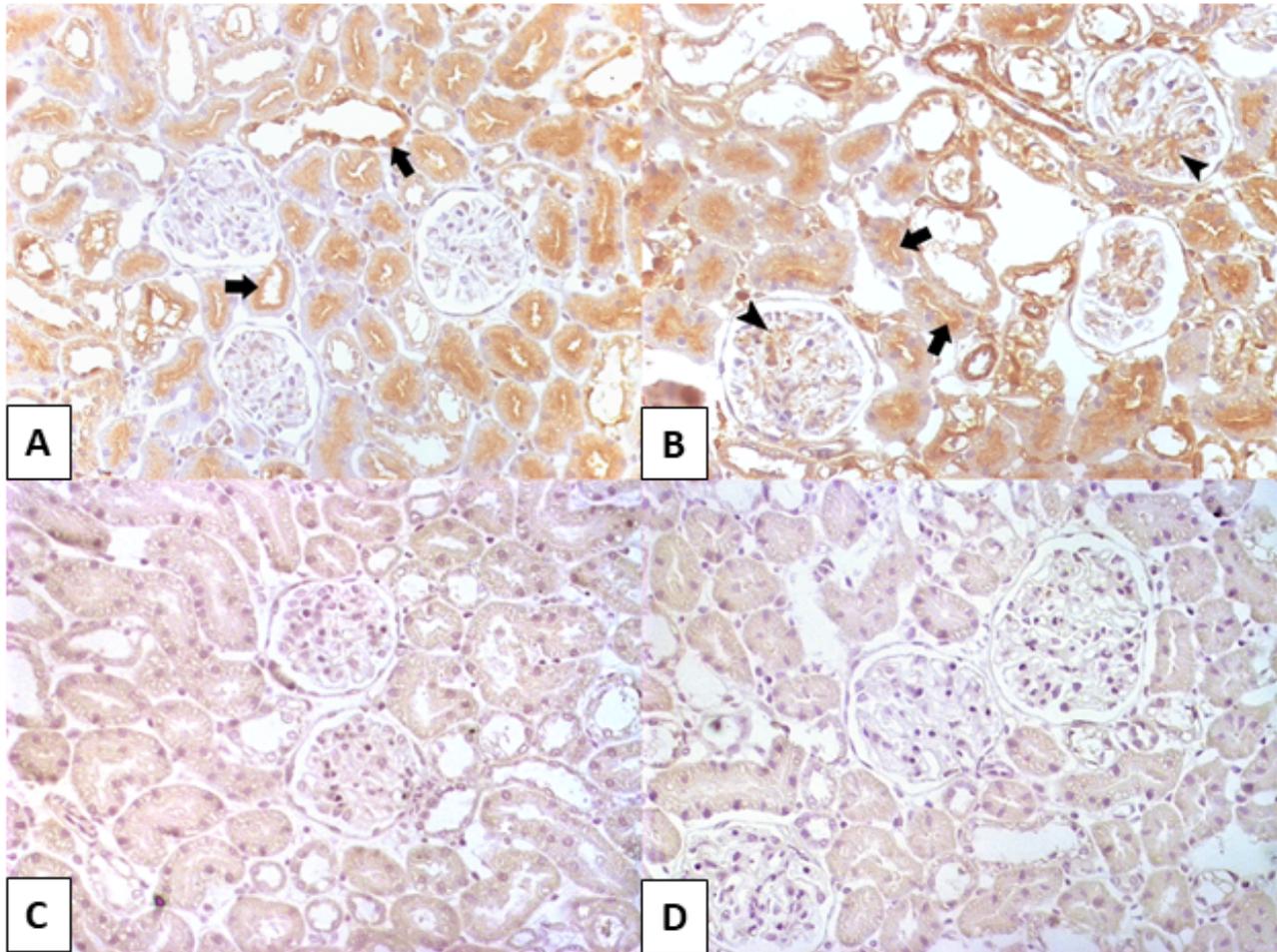


Fig 9. Inmunolocalización del receptor de renina prorenina (PRR) en cortes histológicos de riñón de ratas WKY y SHR. En las imágenes se localiza a la PRR en la corteza renal de ratas WKY (A) y SHR (B) de 6 semanas de edad, en donde se puede identificar con una coloración café. La proteína se encuentra expresada principalmente en las región apical de las células epiteliales tubulares de la corteza renal (flechas). En el caso de la cepa SHR la proteína se encuentra también de manera abundante en los glomérulos (cabeza de flecha). En los controles negativos sin anticuerpo primario no se observa señal positiva en la cepa WKY (C) y SHR (D). Magnificación 40X.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se observó que la proteína de COX-2 esta presente principalmente en la mácula densa de ambas cepas, sin embargo esta enzima tuvo una mayor presencia en otros segmentos de los túbulos renales de las SHR (0.948 ± 0.063 en SHR comparado con 0.75 ± 0.008 fragmentos tubulares por campo en WKY) (Fig 10).

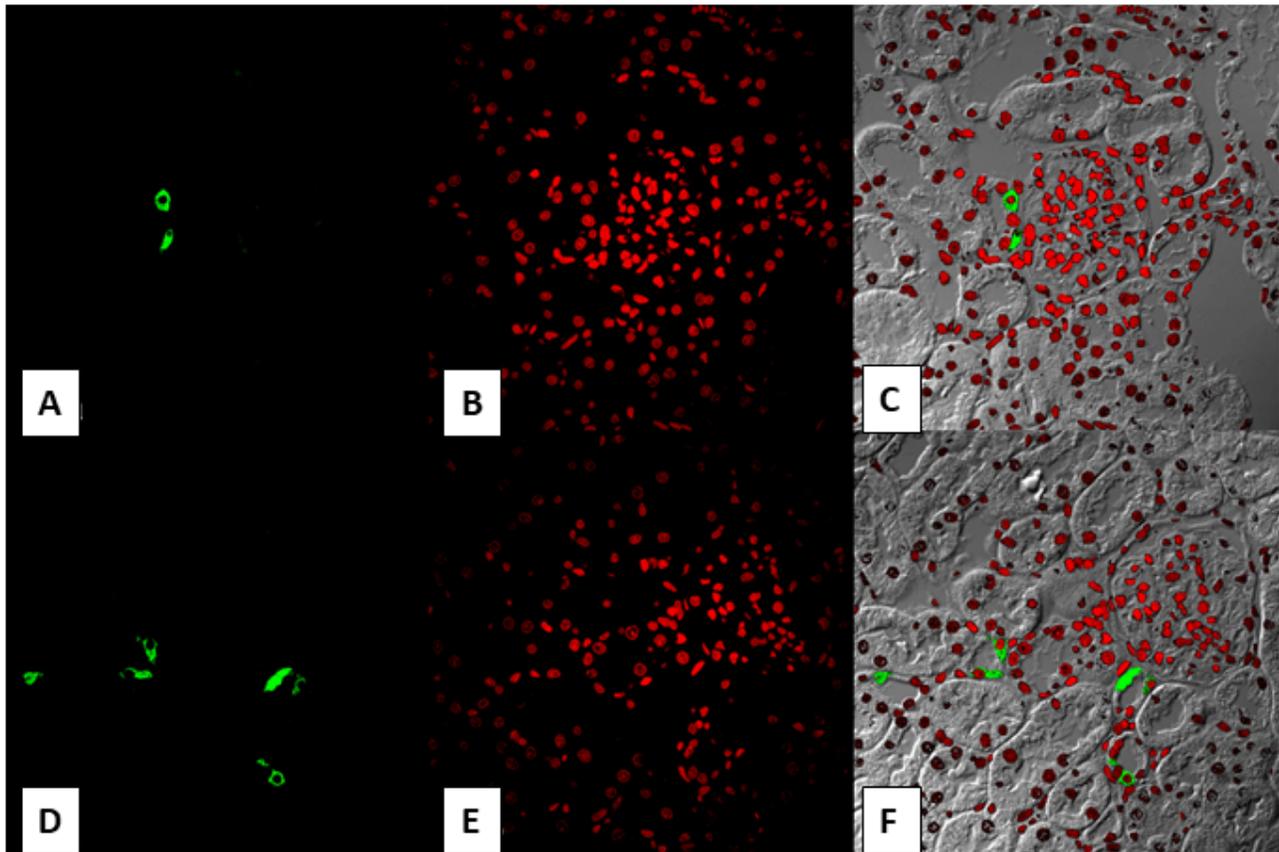


Fig 10. Inmunolocalización de COX-2 en cortes histológicos de riñón de ratas WKY y SHR. La COX-2 está presente en la mácula densa y en células epiteliales tubulares en la cepa SHR con la señal positiva evidenciada por el fluorocromo FITC (color verde brillante), en ratas WKY(A) y SHR (D) de 6 semanas de edad. Los núcleos de las células están marcados con yoduro de propidio en rojo, y se muestra el acoplamiento de ambas marcas con una imagen de contraste de fases, WKY (B y C) Y SHR (E y F) respectivamente. Magnificación 40X.

La proteína de renina se detectó sólo en las células yuxtglomerulares de ambas cepas. El número de glomérulos con células yuxtglomerulares positivas a renina fue similar en la cepa SHR en comparación con la cepa WKY (0.73 ± 0.08 comparado con 0.87 ± 0.05 glomérulos con células yuxtglomerulares positivas a renina por campo respectivamente) (Fig 11).

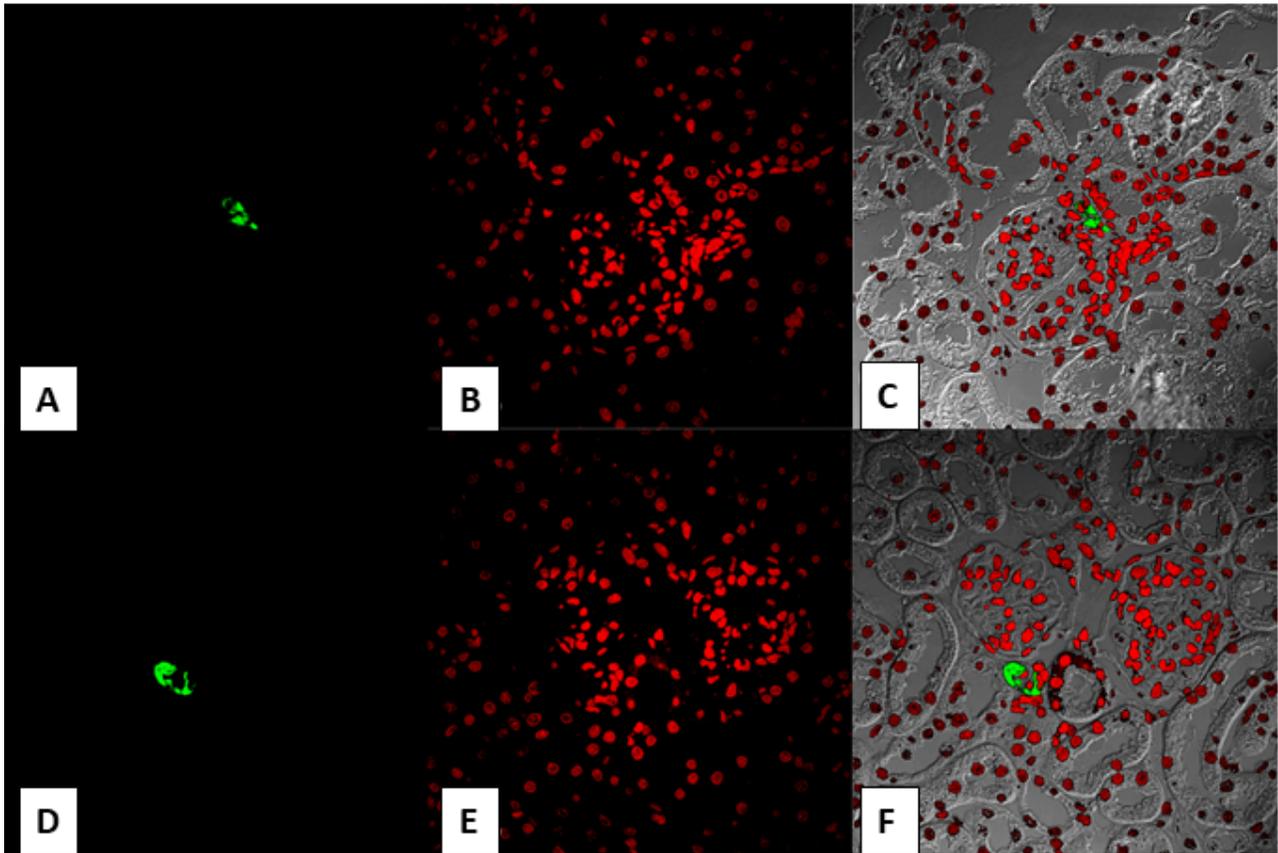


Fig 11. Inmunofluorescencia de renina en cortes histológicos de riñón de ratas WKY y SHR. Expresión de la proteína de renina presente en células yuxtaglomerulares con la señal positiva evidenciada por el fluorocromo FITC (color verde brillante), en corteza renal de ratas WKY(A) y SHR (D) de 6 semanas de edad. Los núcleos de las células están marcados con yoduro de propidio en rojo, y se muestra el acoplamiento de ambas marcas con una imagen de contraste de fases, WKY (B y C) Y SHR (E y F) respectivamente. Magnificación 40X.

6.2.5 Cuantificación relativa del contenido de renina y COX-2 por “Western Blot”.

El perfil de expresión de COX-2 y renina en la corteza renal fue evaluado por medio de la técnica de “Western Blot”. En ambas cepas se detectaron dos bandas de COX-2, una de 72 kDa y otra de 140 kDa, sugiriendo que esta última corresponde a un dímero para la proteína COX-2. Por medio de densitometría se demostró que la expresión de la proteína COX-2 fue mayor en la cepa SHR comparada con la cepa WKY.

Para la proteína renina se detectaron dos bandas en la corteza renal de la cepa SHR una de 54 kDa que corresponde a renina inmadura y una de 37 kDa que corresponde a renina madura. En el caso de la cepa WKY sólo se detectó la banda de 37 kDa y la cantidad de este tipo de renina madura evaluado por densitometría fue significativamente mayor en esta cepa que en la SHR, sin embargo en la SHR la expresión de renina inmadura fue incrementada en la cepa SHR comparada con la cepa WKY (Fig 12).

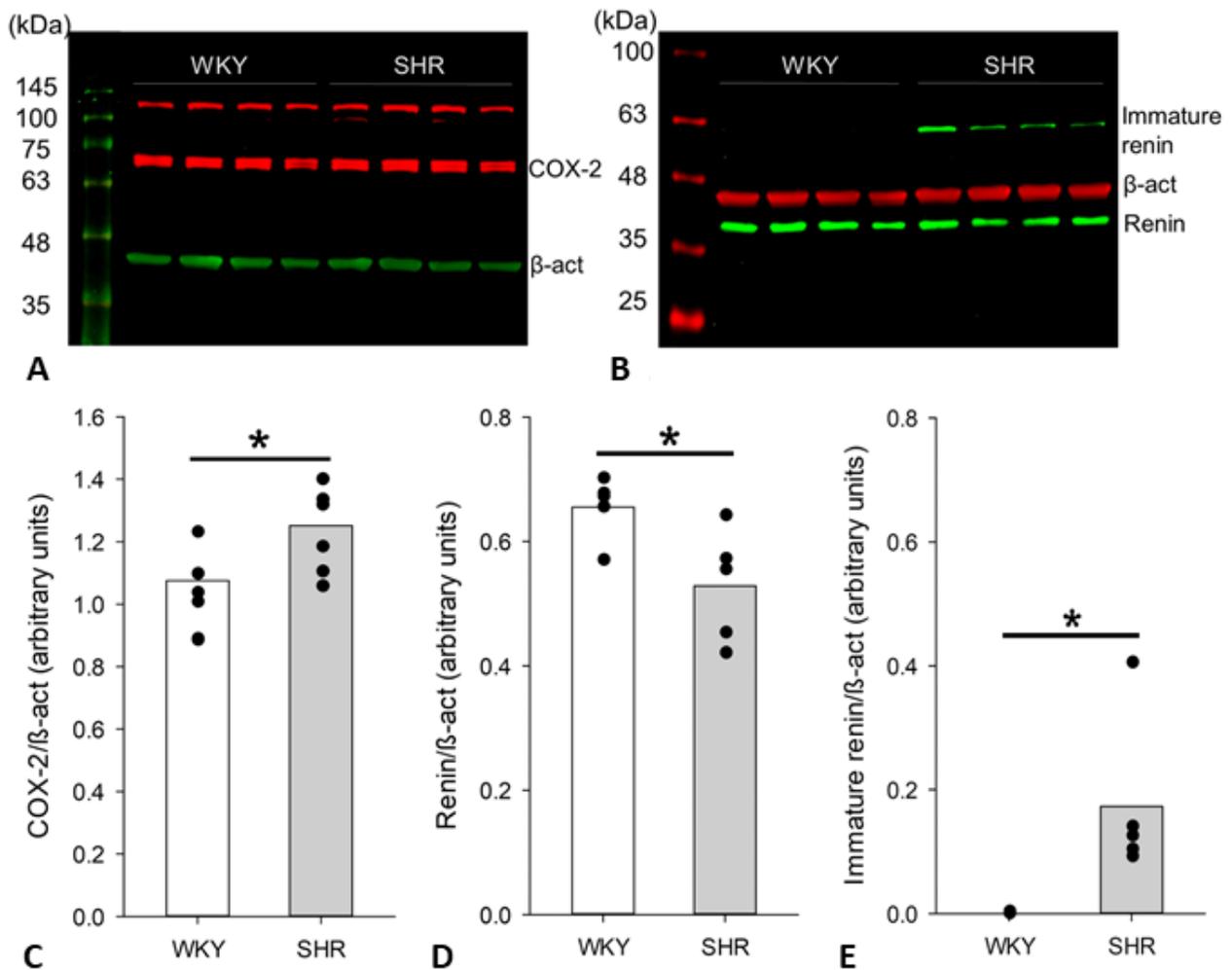
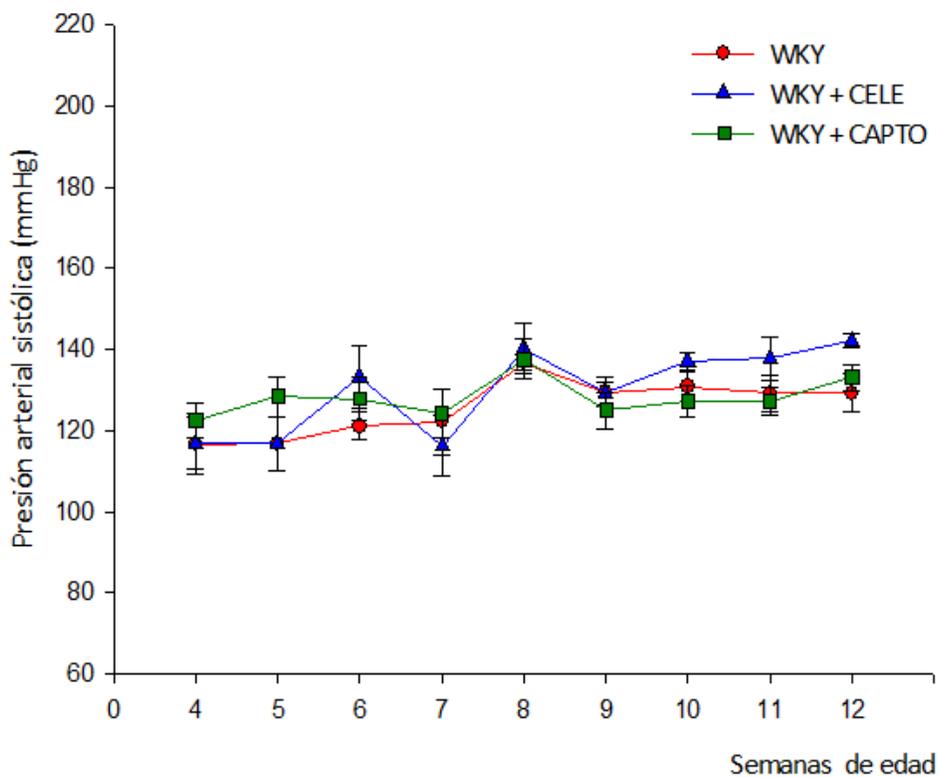


Fig 12. Análisis de la expresión de COX-2 y renina con la técnica de “Western Blot”. Se muestra la proteína de COX-2 en color rojo y la beta actina en color verde (A). También se muestra la expresión de renina madura e inmadura en color verde y la beta actina en color rojo (B). La proteína de COX-2 es más abundante en la corteza renal de la cepa SHR (C). La renina madura es menos abundante en la cepa SHR comparado con la WKY (D), mientras que la renina inmadura fue mucho más abundante en la misma cepa (E). Las barras representan la media y los puntos con los datos individuales. n=6 *P < 0.05 vs WKY.

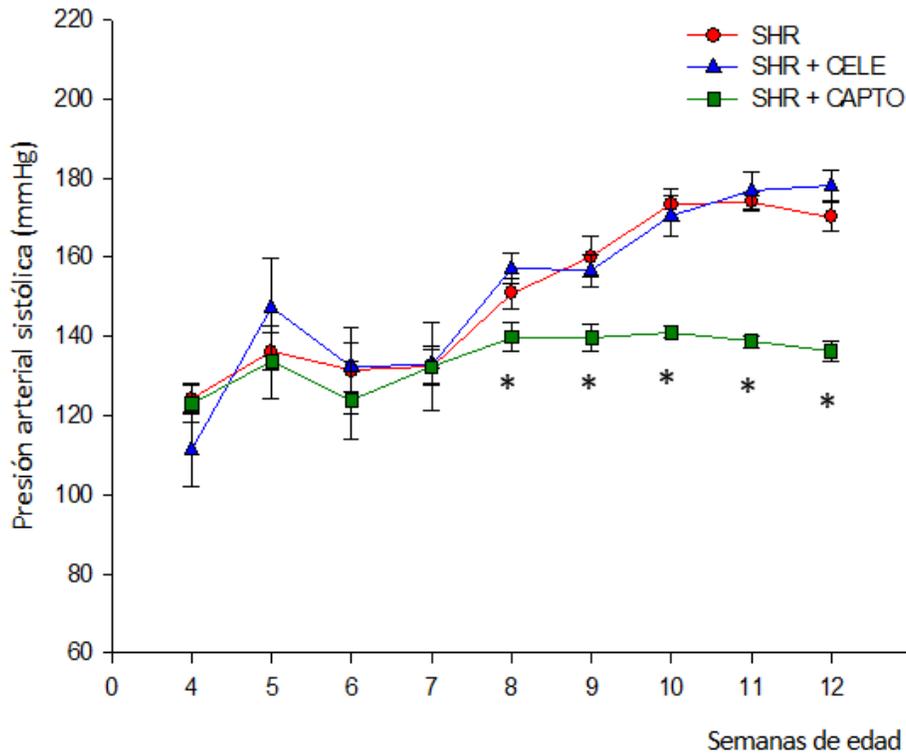
6.3 Tratamiento farmacológico con celecoxib y captopril.

6.3.1 Evaluación de la presión arterial a ratas tratadas con celecoxib y captopril.

La presión arterial no mostró cambios en la cepa WKY debidos al tratamiento presentando valores de presión arterial dentro del rango normal (Fig 13A). La presión arterial de las SHR se elevó a partir de la semana 8 en el grupo sin tratamiento y en el grupo tratado con celecoxib, mientras que el tratamiento con captopril, previno el aumento de la presión arterial (Fig 13B).



A



B

Fig 13. Niveles de presión arterial de ratas WKY y SHR. En la gráfica se presentan los niveles de presión arterial sistólica en milímetros de mercurio (mmHg) de ratas WKY (A) y SHR (B) desde la semana 5 de edad hasta la semana 12 de edad. Los puntos representan la media \pm el error estándar de la media (sem). n=6 *P < 0.05 vs SHR.

6.3.2 Evaluación histopatológica de los grupos tratados farmacológicamente.

La morfología renal de la cepa WKY de 12 semanas de edad mostró características normales y no se vio afectado por ninguno de los tratamientos. El grupo SHR control (Fig 14A), presentó hiperplasia de células mesangiales, aumento de la matriz mesangial, pérdida de células tubulares e incremento en el área de los glomérulos (Fig 15). El tratamiento con celecoxib mejoró la estructura renal al disminuir la hiperplasia y la matriz mesangial (Fig 14E) y se normalizó el área de los glomérulos (Fig 15). En el caso del tratamiento con captopril se observaron alteraciones similares al grupo

control (Fig 14F) y no se presentó mejoría evidente a nivel glomerular mostrando el mismo incremento del área de los glomérulos que en el caso del grupo SHR control (Fig 15).

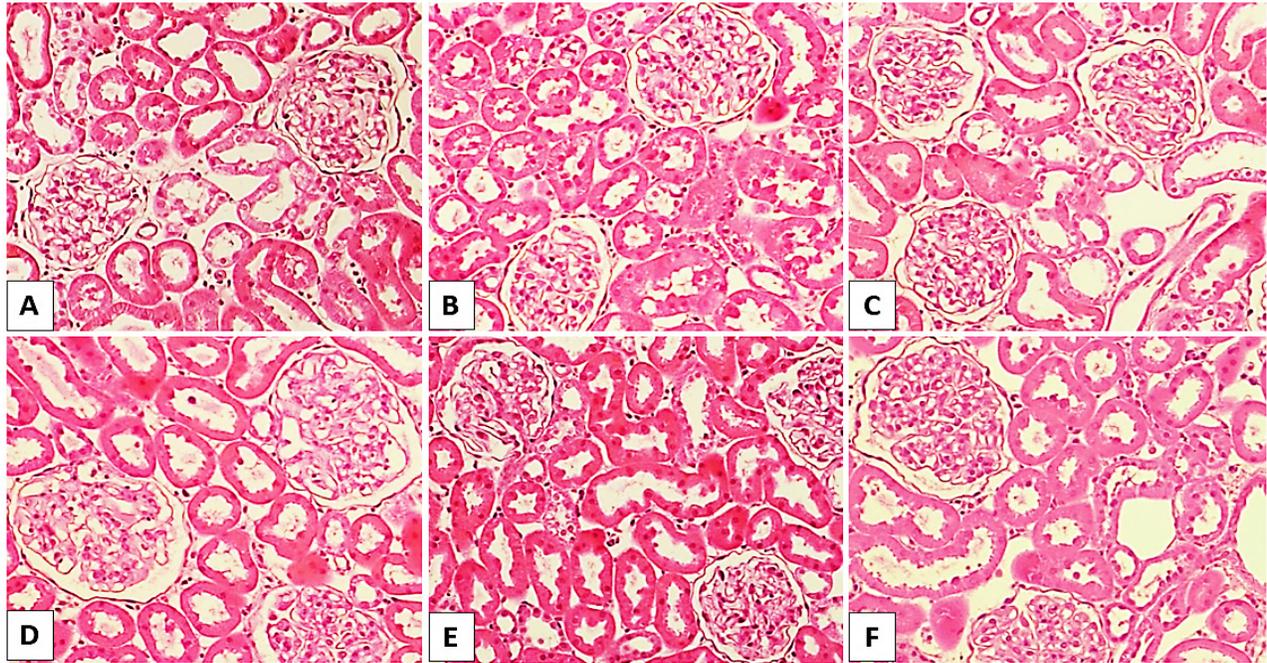


Fig 14. Tinción HyE en cortes histológicos de corteza renal de ratas WKY y SHR. En las imágenes se observan glomérulos renales en cortes histológicos de corteza renal de ratas WKY (A-C) y SHR (D-F) control (A y D), tratadas con celecoxib (B y E) y tratadas con captopril (C y F). Magnificación 20X.

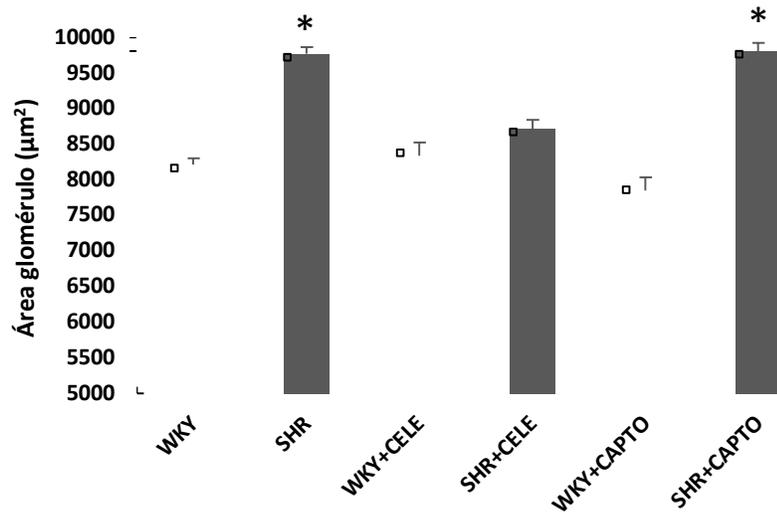


Fig. 15 Evaluación de área del glomérulo. Se presenta el área del glomérulo de ratas WKY y SHR tratadas con celecoxib (WKY+CELE y SHR+CELE respectivamente) y tratadas con captopril (WKY+CAPTO Y SHR+CAPTO respectivamente). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media (sem). n=6 *P < 0.05 vs WKY.

A nivel ultraestructural, evaluamos cambios en el grosor de la membrana basal glomerular (Fig. 16). En el caso de la cepa WKY la morfología de la barrera de filtración no presentó alteraciones en ninguno de los grupos, mientras que en la cepa SHR se encontró el aumento en el grosor de la membrana basal glomerular. El tratamiento con celecoxib normalizó este parámetro, pero no así el tratamiento con captopril, ya que este grupo tuvo un aumento similar al grupo testigo (Fig 17).

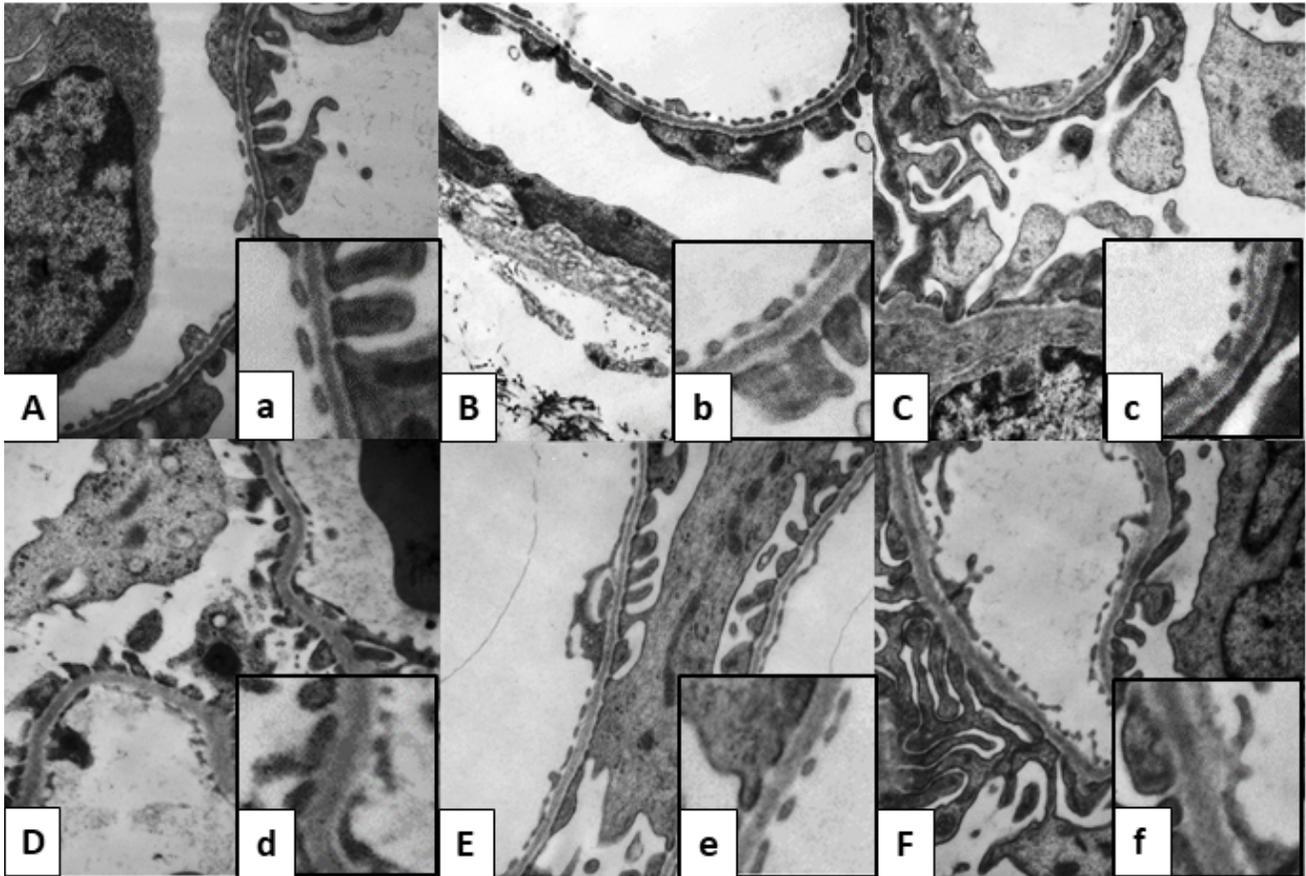


Fig 16. Ultraestructurales de la membrana basal glomerular de ratas WKY y SHR. Se observan imágenes ultraestructurales de la membrana basal del glomérulo (flecha) de ratas WKY (A, B Y C) y SHR (D, E Y F) control (A y D), tratadas con celecoxib (B y E) o tratadas con captopril (C y F). Magnificación 25000X.

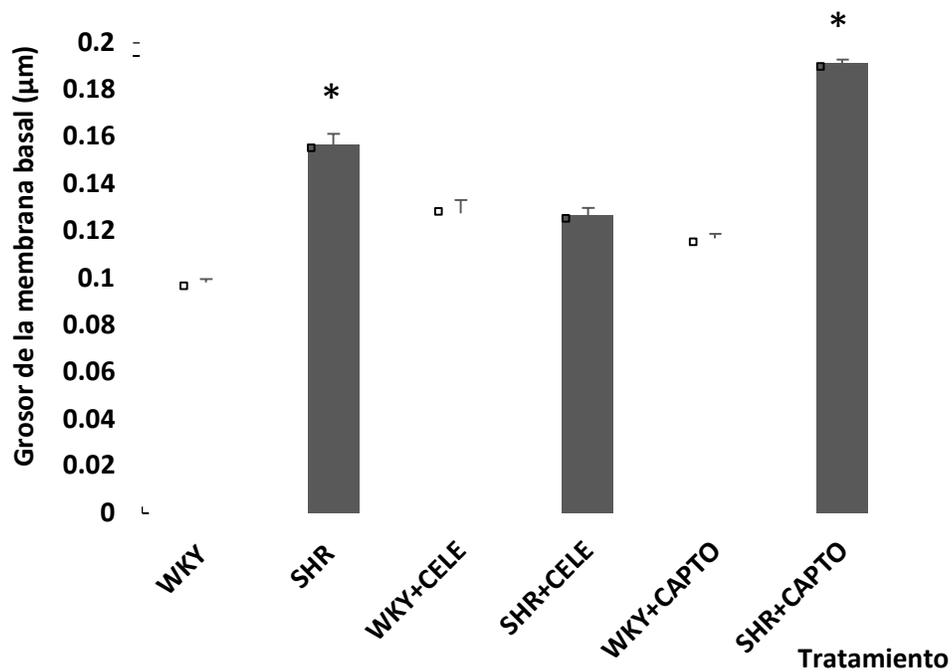


Fig 17. Evaluación del grosor de la membrana basal glomerular. Se presenta el promedio del grosor de la membrana basal glomerular de ratas WKY y SHR control, tratadas con celecoxib (WKY+CELE y SHR+CELE respectivamente) y tratadas con captopril (WKY+CAPTO y SHR+CAPTO, respectivamente). Las barras representan la media \pm el error estándar de la media (sem). n=6 *P < 0.05 vs WKY

7. DISCUSIÓN.

En este trabajo describimos las alteraciones morfológicas y funcionales en una etapa temprana en el desarrollo de la hipertensión arterial en el modelo SHR e identificamos cambios en la expresión y localización de COX-2, renina, PRR y otros componentes del SRA, como Ang II y Ang (1-7), así también evaluamos la relación entre las alteraciones morfológicas y dichas vías enzimáticas una vez que la hipertensión arterial se está estableciendo en la cepa SHR.

Nuestros datos mostraron un incremento en el área de los glomérulos renales en las ratas SHR prehipertensas comparados con las ratas WKY sugiriendo la presencia de hipertrofia glomerular en estas ratas jóvenes, una posible causa de esta alteración es la hiperplasia de células mesangiales, misma que se observó en los glomérulos de la cepa SHR. Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que las células mesangiales de la cepa SHR muestran una mayor tasa de crecimiento que aquellas de la cepa WKY (Lopes de Faria y cols. 1997). Además, en respuesta a diferentes estímulos las células mesangiales pueden adquirir un fenotipo activo y mostrar hipertrofia, proliferación y un aumento en la producción de proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento y citocinas (Abboud y cols., 2012; Schlondorff y Banas, 2009). De esa manera las células mesangiales de los glomérulos en las SHR de seis semanas de edad pueden estar respondiendo a estímulos paracrinos y autocrinos que inducen su activación y un proceso inflamatorio temprano que puede contribuir a la hipertrofia glomerular.

Además de los cambios morfológicos mencionados anteriormente la membrana basal glomerular de las SHR mostró diversas regiones con apariencia multi laminar. Aunque este fenómeno no se observó en la mayoría de los capilares de los glomérulos de esta cepa, lo que descarta al síndrome de Alport; ya que no presentan mutaciones en los genes que codifican a la colágena IV que es una de las características de este síndrome (Lin y cols., 2014).

Las SHR son prehipertensas por las primeras 6 semanas de vida cuando su presión arterial fue de 100-120 mmHg (Adams y cols., 1989; Dang y cols., 1999., Rodríguez-Iturbe y cols., 2005), cuando son adultas su presión arterial alcanzan de 180-200 mmHg (Pinto y cols., 1998). Aunque otros

autores han reportado aumento en los niveles de presión arterial mayores a 140 mmHg antes de las 6 semanas de edad (Fukuda y cols., 2004; Lee y cols., 2010; Tikellis y cols., 2006), nosotros decidimos evaluar 6 semanas de edad debido a que representa un periodo en el que las SHR de nuestra colonia aún es prehipertensa (Castro-Moreno y cols., 2012).

La ausencia de diferencias significativas en la presión arterial de las dos cepas, indica que el surgimiento de los cambios morfológicos observados en el riñón de las ratas SHR de 6 semanas de edad son independientes del aumento de la presión arterial que se presenta en la cepa SHR en edades más avanzadas y parecen más estar relacionados a mecanismos neuroendocrinos o inflamatorios.

En este estudio demostramos un incremento en la expresión de la proteína de COX-2 en la corteza renal de las ratas SHR prehipertensas. Estudios previos demostraron que la sobreexpresión de COX-2 está implicada en daño renal progresivo en un modelo de nefropatía inducida por ablación renal en ratas, debido a que la inhibición crónica de la COX-2 atenuó el daño al reducir la hipertensión glomerular y la inflamación renal (Fujihara y cols., 1998). Además el tratamiento con Celecoxib un inhibidor selectivo de la COX-2 previno la hipertrofia de los túbulos proximales y la proporción proteína/DNA en ratas diabéticas (Vázquez-Cruz y cols., 2013) indicando que la COX-2 está implicada en el desarrollo de la hipertrofia renal en la diabetes. También se demostró que la COX-2 promueve la proliferación de las células mesangiales en cultivo celular bajo condiciones de estrés (Li y cols., 2016). Por lo que nuestros resultados sugieren que los prostanoïdes derivados de la COX-2 pueden estar asociados con las alteraciones morfológicas en el riñón de las SHR prehipertensas.

En este estudio demostramos un incremento en la expresión de la proteína de COX-2 en la corteza renal de las ratas SHR prehipertensas. Estudios previos demostraron que la sobreexpresión de COX-2 está implicada en daño renal progresivo en un modelo de nefropatía inducida por ablación renal en ratas, debido a que la inhibición crónica de la COX-2 atenuó el daño al reducir la hipertensión glomerular y la inflamación renal (Fujihara y cols., 1998). Además el tratamiento con celecoxib, un inhibidor selectivo de la COX-2, previno la hipertrofia de los túbulos proximales y la proporción proteína/DNA en ratas diabéticas (Vázquez-Cruz y cols., 2013) indicando que la COX-2 está implicada

en el desarrollo de la hipertrofia renal en la diabetes. También se demostró que la COX-2 promueve la proliferación de las células mesangiales en cultivo celular bajo condiciones de estrés (Li y cols., 2016). Por lo que nuestros resultados sugieren que los prostanoïdes derivados de la COX-2 pueden estar asociados con las alteraciones morfológicas en el riñón de las SHR prehipertensas.

En este estudio se localizó a la COX-2 en células tubulares sin embargo no se identificó la región tubular en la que esta proteína está presente. En ratas se ha demostrado la presencia de COX-2 en la región de la mácula densa y en la porción gruesa ascendente del asa de Henle en la corteza y en la médula externa (Harris y cols., 1994; Vio y cols., 2001). Con respecto al significado funcional de la presencia de COX-2 en estas regiones de la corteza renal, se ha demostrado que esta enzima participa en la reabsorción tubular de sodio y en la liberación de la renina (Harris y cols., 1994; Peti-Peterdi y Harris 2010) también participa en la regulación de la retroalimentación túbulo glomerular y en la regulación de la respuesta de las arteriolas aferentes ante el aumento de presión (Ichihara y cols., 1999).

Es posible que la sobreexpresión de COX-2 en la corteza renal de SHR como se demuestra en este estudio, también contribuya a la sobre activación de RAS al promover el incremento en la producción de renina en las SHR prehipertensas. A este respecto, se encontró una mayor cantidad de renina inmadura y disminución en la cantidad de renina madura en la corteza renal de SHR, estos datos aparentemente contradictorios se pueden explicar por reportes previos que mostraron que la liberación de renina madura en condiciones basales en la cepa SHR era mayor en comparación con el control (Henrich y Levi, 1991); por lo cual sólo encontramos aumentada la renina inmadura que no puede ser secretada. Otra evidencia de la sobreactivación de RAS demostrada en este estudio es una mayor concentración de Ang II plasmática en las ratas SHR prehipertensas comparadas con las ratas WKY. Esta información sugiere que en las SHR prehipertensas podría estar presente un mecanismo de regulación entre COX-2 y renina como se ha demostrado en otros modelos de hipertensión (Guzman-Hernández y cols., 2015).

Sin embargo, no se puede descartar la participación de otros sistemas en la activación del RAS en estas ratas, debido a que la actividad del sistema nervioso simpático está incrementada en ratas

SHR prehipertensas (Cates y cols., 1985; Dang y cols., 1999; Larsen y cols., 2016). Es bien sabido que este sistema incrementa la liberación de renina a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos beta1 en células yuxtaglomerulares. En este estudio la cepa SHR prehipertensa mostró incremento en el pulso cardiaco comparado con la cepa WKY un marcador del sistema nervioso simpático (Shanks y cols., 2013), por lo que este sistema también puede estar involucrado en la activación del RAS en las SHR prehipertensas. Además el sistema nervioso simpático y la sobre activación de RAS pueden estar relacionados a la hipertrofia de las arteriolas y al incremento en los niveles de colágena vasculares que observamos en esta etapa en las SHR; debido a que la infusión de angiotensina II promueve la hipertrofia de la aorta a través de sus receptores AT1 y a receptores adrenérgicos alfa 1D (Gallardo-Ortiz y cols., 2015). El engrosamiento de las paredes vasculares puede ocasionar a su vez alteraciones a los tejidos irrigados ya que la distancia de difusión del oxígeno a través del músculo liso incrementa ocasionando hipertrofia y daño isquémico al glomérulo y a las estructuras túbulo intersticiales (Mennuni y cols., 2014).

En este estudio se observó una mayor presencia de matriz extracelular en la cepa SHR que no se observó en la cepa WKY mediante la tinción de PAS y se confirmó con la tinción tricrómica de Masson que detecta fibras de colágena que es una de las principales proteínas de matriz extracelular. Esta evidencia indica que el incremento de la matriz extracelular puede contribuir a las alteraciones morfológicas observadas en el riñón de las ratas prehipertensas, ya que el aumento en el grosor de la membrana basal glomerular y el incremento en la producción de matriz extracelular se han relacionado con la hipertrofia glomerular (MacKay y cols., 1990; Miner, 2011). Aunado a lo anterior, tanto COX-2 como SRA están entre las vías implicadas en la estimulación de la producción de matriz extracelular. En un modelo de hipertensión renovascular, la fibrosis intersticial renal disminuyó después de la inhibición de COX-2 (Richter y cols., 2004). Además diferentes componentes de SRA como Ang II, Ang III y la aldosterona son promotores de la fibrosis al activar la señalización de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que regula la producción de matriz extracelular (Macconi y cols., 2011; Mennuni y cols., 2014; Wolf, 2006). Otros estudios han mostrado que la sobre actividad de SRA y COX-2 también está relacionada el daño a otras células esenciales en la función glomerular como son los podocitos (Agrawal y cols., 2014; Huby y cols., 2009; Nijenhuis y cols., 2011). En el glomérulo estas células están implicadas en

la remodelación de la membrana basal glomerular ya que sintetizan y ensamblan los componentes de la matriz extracelular y producen metaloproteasas de matriz extracelular en condiciones normales y patológicas (Shankland, 2006).

La disminución en los niveles de Ang (1-7) observados en este estudio también pueden contribuir a las alteraciones renales de las ratas SHR prehipertensas, debido a que tiene actividad renoprotectora y contrarresta los efectos de Ang II en condiciones patológicas como la diabetes y la hipertensión (Padda y cols., 2015; Patel y cols., 2016).

Otro de los componentes del SRA evaluado en este estudio a la edad de 6 semanas fue el receptor de renina prorrenina (PRR). Recientemente se demostró que este receptor, se encuentra localizado en las células mesangiales, podocitos, la mácula densa, los túbulos contorneados proximales y distales y en mayor cantidad en la superficie luminal de las células intercaladas (Advani y cols., 2009; Huang y cols., 2006). La proteína de PRR se detectó en la membrana apical de los túbulos renales en la corteza de las ratas WKY y SHR prehipertensas de 6 semanas de edad, aunque no se caracterizó la región de los túbulos renales en los cual se expresaba este receptor. PRR también se localizó en los glomérulos de las dos cepas pero fue más abundante en la cepa SHR en comparación con las WKY. El incremento de renina inmadura observada en la corteza renal de las SHR prehipertensas también puede estar implicado en las alteraciones renales observadas a través de la activación de PRR en esta cepa de ratas.

Para evaluar si los cambios morfológicos observados en este estudio estaban relacionados con alteraciones funcionales en el riñón, se evaluaron los niveles plasmáticos de urea y creatinina. No encontrando cambios en estos parámetros en las SHR prehipertensas lo que indicó que la función renal todavía no se había alterado o también a la presencia de una adaptación compensatoria de la masa renal residual que enmascara la pérdida de la función (Cowgill y cols., 2016). Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que demostraron que la excreción urinaria de bio marcadores de daño renal temprano, como albúmina, osteopontina y KIM-1 no estaban modificados en SHR de 6 Y 8 semanas de edad (Gan y cols., 2018; Heijnen y cols., 2014; Inoue y cols., 2013).

Para conocer si la COX-2 y el SRA participaban en las alteraciones morfológicas encontradas, se realizó la inhibición farmacológica de COX-2 y de la inhibición la ECA desde una etapa prehipertensiva (4 semanas de edad), hasta las 12 semanas de edad, cuando la hipertensión ya se está estableciendo.

En este estudio se demostró que los prostanoides producidos por la COX-2 están relacionados con alteraciones estructurales en el riñón como el aumento del área del glomérulo y el grosor de la membrana basal glomerular en la cepa SHR, porque la inhibición de esta enzima con el fármaco celecoxib previno la aparición de estas alteraciones. En otros estudios de daño renal también se ha reportado la participación de la COX-2 en alteraciones renales, como es en el modelo de ratas hipertensas fawn-hooded en el que se encontró aumento de esta ciclooxigenasa previamente al desarrollo de glomeruloesclerosis (Weichert y cols., 2000), así mismo, se demostró en un modelo de enfermedad renal poliquística que la administración de celecoxib disminuye alteraciones como el índice fibrótico y la infiltración leucocitaria al riñón, así como, la proliferación celular de células epiteliales quísticas por un mecanismo dependiente de la vía de señalización VEGF/VEGFR-2/Raf-1/MAPK/ERK (Xu y cols., 2012).

Cabe destacar el hecho de que el Celecoxib no evitó el aumento en la presión sanguínea en la SHR, una posible explicación es que al inhibir a COX-2 estamos bloqueando parcialmente la producción de prostanoides. Las prostaglandinas producto de las ciclooxigenasas son importantes reguladores de la función renal y de la presión sanguínea a través de diferentes mecanismos como son promover la excreción de sodio y agua y actuar como moléculas vasoactivas. Los prostanoides asociados a la COX-2 en el riñón como la PGI₂ y la PGE₂ tienen un efecto vasodilatador que contrarresta el aumento de la presión sanguínea, por lo que la inhibición de la COX-2 con celecoxib puede estar afectando estas funciones.

Por otra parte también demostramos que el aumento de la presión sanguínea en la cepa SHR está relacionado con la sobre activación del SRA, como se demostró por los niveles elevados de Ang II y la disminución de Ang (1-7) desde una edad prehipertensa y porque la inhibición de la enzima

convertidora de angiotensina (ECA) con el fármaco captopril, previno el aumento de la presión sanguínea en esta cepa. Algunos de los mecanismos que intervienen para disminuir la presión sanguínea por la inhibición de la ECA son principalmente la disminución en la producción del principal efector del sistema: la Ang II, sin embargo también se ha demostrado que el captopril ocasiona el aumento de la Ang (1-7) (Castro-Moreno y cols., 2012) que tiene función vasodilatadora que contrarresta el efecto de la Ang II. Además se bloquea la función inhibitoria de la ECA sobre la bradicinina, otra molécula con función vasodilatadora.

Otro hallazgo interesante fue que el tratamiento con captopril no previno las alteraciones morfológicas en el riñón como podríamos esperar; debido a que se ha reportado que el tratamiento con este fármaco previene alteraciones estructurales y funcionales en arterias de bajo calibre del lecho vascular mesentérico en SHR (Lee y cols 1991). Una posible explicación a este fenómeno es la intervención de otros componentes del RAS en las alteraciones estructurales presentes en la cepa SHR, específicamente la renina, cuya cantidad puede aumentar al disminuir el efecto de retroalimentación negativa que tiene sobre esta enzima la Ang II cuando se bloquea su producción por efecto del captopril y a través de mecanismos independientes de la activación de la vía clásica de RAS y que se relacionan con la unión a su receptor PRR.

Se ha descrito que el PRR activa la vía de señalización de las proteínas cinasas dependientes de mitógenos (MAPK), específicamente ERK 1/2, en muchos tipos celulares en el riñón incluyendo las células de los conductos colectores (Advani y cols., 2009; Huang y cols., 2006). La activación de ERK 1/2 incrementa la proliferación celular y estimula la producción de TGF- β y la sobreexpresión de factores profibroticos como el inhibidor del activador de plasminógeno, la fibronectina y colágena (Krop y cols., 2013). La activación de PRR también está relacionada a daño vascular en el riñón (Rusai y cols., 2011) e incluso se ha encontrado que PRR de manera directa o indirecta contribuye a la regulación de la expresión de COX-2 en la corteza renal (Gonzalez y cols., 2013; Kaneshiro y cols., 2006). Lo cual explica por qué, aun cuando se está inhibiendo a la ECA con el captopril no mejoran las alteraciones estructurales.

Por otra parte es importante tomar en cuenta evidencia de la retroalimentación negativa de la Ang II sobre COX-2 (Harris y cols., 2004), por lo que es posible que al inhibir su producción con captopril aumente la expresión de COX-2, lo que estaría contribuyendo a las alteraciones morfológicas encontradas. Además, existe evidencia del aumento de la PGI₂ relacionada con COX-2 en el riñón por efecto del tratamiento con captopril en un modelo de hipertensión arterial inducido por L-NAME (Guzmán-Hernández y cols., 2015), lo que soportaría esta teoría.

8. CONCLUSIONES.

- Este estudio proporciona información relevante sobre la presencia de cambios morfológicos renales como el aumento en el tamaño de los glomérulos y de la membrana basal glomerular antes del incremento en la presión sanguínea en las SHR.
- Se identificó un aumento en la expresión COX-2 en la corteza renal y aumento de la presencia de esta enzima en túbulos renales en las SHR a las 6 semanas de edad.
- En la edad prehipertensa de 6 semanas de edad en las SHR, se encontraron alteraciones en varios componentes del SRA como son: el aumento de renina inmadura, la presencia de PRR en glomérulos, así como, el aumento de Ang II plasmática y disminución de Ang (1-7).
- No se observaron cambios funcionales en la etapa prehipertensa por lo que es posible que los mecanismos de adaptación compensatoria de la masa renal residual estén enmascarando la pérdida de la función.
- La COX-2 contribuye a las alteraciones morfológicas encontradas en la cepa SHR, sin embargo estas alteraciones no contribuyen al aumento de la presión arterial a las 12 semanas de edad aunque, no se descarta que contribuyan en etapas posteriores al mantenimiento de la HTA.
- El SRA interviene en el aumento de la presión sanguínea en la cepa SHR y posiblemente también con las alteraciones morfológicas encontradas en este estudio por un mecanismo que puede estar relacionado con la unión de renina a su receptor PRR.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abboud H. E. (2012). Mesangial cell biology. *Experimental cell research*, 318(9), 979–985.
2. Adams, M. A., Bobik, A., & Korner, P. I. (1989). Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 14(2), 191–202.
3. Advani, A., Kelly, D. J., Cox, A. J., White, K. E., Advani, S. L., Thai, K., Connelly, K. A., Yuen, D., Trogadis, J., Herzenberg, A. M., Kuliszewski, M. A., Leong-Poi, H., & Gilbert, R. E. (2009). The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 54(2), 261–269.
4. Agrawal, S., Guess, A. J., Chanley, M. A., & Smoyer, W. E. (2014). Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2. *Kidney international*, 86(6), 1150–1160.
5. Beierwaltes W. H. (2010). The role of calcium in the regulation of renin secretion. *American journal of physiology. Renal physiology*, 298(1), F1–F11.
6. Bruggeman, L. A., Horigan, E. A., Horikoshi, S., Ray, P. E., & Klotman, P. E. (1991). Thromboxane stimulates synthesis of extracellular matrix proteins in vitro. *The American journal of physiology*, 261(3 Pt 2), F488–F494.
7. Castro-Moreno, P., Pardo, J. P., Hernández-Muñoz, R., López-Guerrero, J. J., Del Valle-Mondragón, L., Pastelín-Hernández, G., Ibarra-Barajas, M., & Villalobos-Molina, R. (2012). Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Autonomic & autacoid pharmacology*, 32(3 Pt 4), 61–69.
8. Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., & Wagner, C. (2010). Physiology of kidney renin. *Physiological reviews*, 90(2), 607–673.
9. Catella-Lawson, F., McAdam, B., Morrison, B. W., Kapoor, S., Kujubu, D., Antes, L., Lasseter, K. C., Quan, H., Gertz, B. J., & FitzGerald, G. A. (1999). Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 289(2), 735–741.

10. Cates, M. J., Steed, P. W., Abdala, A. P., Langton, P. D., & Paton, J. F. (2011). Elevated vertebralbasilar artery resistance in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 111(1), 149–156.
11. Chenevard, R., Hürlimann, D., Béchir, M., Enseleit, F., Spieker, L., Hermann, M., Riesen, W., Gay, S., Gay, R. E., Neidhart, M., Michel, B., Lüscher, T. F., Noll, G., & Ruschitzka, F. (2003). Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation*, 107(3), 405–409.
12. Cheng, H., Fan, X., Guan, Y., Moeckel, G. W., Zent, R., & Harris, R. C. (2009). Distinct roles for basal and induced COX-2 in podocyte injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(9), 1953–1962.
13. Cheng, H. F., & Harris, R. C. (2004). Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 43(3), 525–530.
14. Cheng, H. F., Wang, C. J., Moeckel, G. W., Zhang, M. Z., McKanna, J. A., & Harris, R. C. (2002). Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney international*, 62(3), 929–939.
15. Cheng, H. F., Wang, J. L., Vinson, G. P., & Harris, R. C. (1998). Young SHR express increased type 1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *The American journal of physiology*, 274(1), F10–F17.
16. Cheng, H. F., Wang, J. L., Zhang, M. Z., Miyazaki, Y., Ichikawa, I., McKanna, J. A., & Harris, R. C. (1999). Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *The Journal of clinical investigation*, 103(7), 953–961.
17. Chun, K. S., & Surh, Y. J. (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochemical pharmacology*, 68(6), 1089–1100.
18. Coffman T. M. (2011). Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature medicine*, 17(11), 1402–1409.
19. Correa, F. M., Viswanathan, M., Ciuffo, G. M., Tsutsumi, K., & Saavedra, J. M. (1995). Kidney angiotensin II receptors and converting enzyme in neonatal and adult Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Peptides*, 16(1), 19-24.

20. Cowgill, L. D., Polzin, D. J., Elliott, J., Nabity, M. B., Segev, G., Grauer, G. F., Brown, S., Langston, C., & van Dongen, A. M. (2016). Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 46(6), 995–1013.
21. Cowley A. W., Jr (2006). The genetic dissection of essential hypertension. *Nature reviews. Genetics*, 7(11), 829–840.
22. Crowley, S. D., & Coffman, T. M. (2012). Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Experimental cell research*, 318(9), 1049–1056.
23. D'Abril Ruíz-Leyja, E., Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J. J., Gallardo-Ortíz, I. A., Estrada-Soto, S. E., & Ibarra-Barajas, M. (2013). Differential role of cyclooxygenase-1 and -2 on renal vasoconstriction to α_1 -adrenoceptor stimulation in normotensive and hypertensive rats. *Life sciences*, 93(16), 552–557.
24. Dang, A., Zheng, D., Wang, B., Zhang, Y., Zhang, P., Xu, M., Liu, G., & Liu, L. (1999). The role of the renin-angiotensin and cardiac sympathetic nervous systems in the development of hypertension and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 22(3), 217–221.
25. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*, 52(3), 415–472.
26. Díez Martínez Javier (2009). Patogenia de la hipertensión arterial. *Nefrología clínica*. 3ª ed Edit Medica Panamericana. Pag 222
27. Dornas, W. C., & Silva, M. E. (2011). Animal models for the study of arterial hypertension. *Journal of biosciences*, 36(4), 731–737.
28. Dovinová, I., Barancik, M., Majzunova, M., Zorad, S., Gajdosechová, L., Gresová, L., Cacanyiova, S., Kristek, F., Balis, P., & Chan, J. Y. (2013). Effects of PPAR γ Agonist Pioglitazone on Redox-Sensitive Cellular Signaling in Young Spontaneously Hypertensive Rats. *PPAR research*, 2013, 541871.
29. Efrati, S., Berman, S., Goldfinger, N., Erez, N., Averbukh, Z., Golik, A., Rotter, V., & Weissgarten, J. (2007). Enhanced angiotensin II production by renal mesangium is responsible for apoptosis/proliferation of endothelial and epithelial cells in a model of malignant hypertension. *Journal of hypertension*, 25(5), 1041–1052.

30. Endlich, N., & Endlich, K. (2012). The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension. *Seminars in nephrology*, 32(4), 327–341.
31. Feitoza, C. Q., Câmara, N. O., Pinheiro, H. S., Gonçalves, G. M., Cenedeze, M. A., Pacheco-Silva, A., & Santos, O. F. (2005). Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *International immunopharmacology*, 5(1), 79–84.
32. Félétou, M., Huang, Y., & Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British journal of pharmacology*, 164(3), 894–912.
33. Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B., & Diz, D. I. (1997). Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 30(3 Pt 2), 535–541.
34. FitzGerald G. A. (2003). COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(11), 879–890.
35. Fleming, I., Kohlstedt, K., & Busse, R. (2006). The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 15(1), 8–13.
36. Francois, H., Athirakul, K., Mao, L., Rockman, H., & Coffman, T. M. (2004). Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 43(2), 364–369.
37. Fujihara, C. K., Antunes, G. R., Mattar, A. L., Andreoli, N., Malheiros, D. M., Noronha, I. L., & Zatz, R. (2003). Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition limits abnormal COX-2 expression and progressive injury in the remnant kidney. *Kidney international*, 64(6), 2172–2181.
38. Fukuda, S., Tsuchikura, S., & Iida, H. (2004). Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/lzm, SHRSP/lzm and WKY/lzm. *Experimental animals*, 53(1), 67–72.
39. Fyhrquist, F., & Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*, 264(3), 224–236.
40. Gallardo-Ortíz, I. A., Rodríguez-Hernández, S. N., López-Guerrero, J. J., Del Valle-Mondragón, L., López-Sánchez, P., Touyz, R. M., & Villalobos-Molina, R. (2015). Role of α 1D -adrenoceptors in vascular wall hypertrophy during angiotensin II-induced hypertension. *Autonomic & autacoid pharmacology*, 35(3), 17–31.

41. Gan, Z., Huang, D., Jiang, J., Li, Y., Li, H., & Ke, Y. (2018). Captopril alleviates hypertension-induced renal damage, inflammation, and NF- κ B activation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 51(11), e7338.
42. Greka, A., & Mundel, P. (2012). Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology*, 74, 299–323.
43. Gonzalez, A. A., Luffman, C., Bourgeois, C. R., Vio, C. P., & Prieto, M. C. (2013). Angiotensin II-independent upregulation of cyclooxygenase-2 by activation of the (Pro)renin receptor in rat renal inner medullary cells. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 61(2), 443–449.
44. Grosser, T., Fries, S., & FitzGerald, G. A. (2006). Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 116(1), 4–15.
45. Gurley, S. B., Riquier-Brison, A., Schnermann, J., Sparks, M. A., Allen, A. M., Haase, V. H., Snouwaert, J. N., Le, T. H., McDonough, A. A., Koller, B. H., & Coffman, T. M. (2011). AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell metabolism*, 13(4), 469–475.
46. Guyton AC (2019). La circulación. En Guyton: Tratado de fisiología médica. 12^oed. Elsevier España, pp. 156-224.
47. Guzmán-Hernández, E. A., Villalobos-Molina, R., Sánchez-Mendoza, M. A., Del Valle-Mondragón, L., Pastelín-Hernández, G., & Ibarra-Barajas, M. (2015). Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 93(4), 299–308.
48. Hao, C. M., & Breyer, M. D. (2008). Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annual review of physiology*, 70, 357–377.
49. Harris, R. C., & Breyer, M. D. (2006). Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 1(2), 236–245.
50. Harris, R. C., Zhang, M. Z., & Cheng, H. F. (2004). Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta physiologica Scandinavica*, 181(4), 543–547.

51. Harrison D. G. (2013). The mosaic theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH*, 7(1), 68–74.
52. Heijnen, B. F., Van Essen, H., Schalkwijk, C. G., Janssen, B. J., & Struijker-Boudier, H. A. (2014). Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 37(2), 100–109.
53. Hemstreet GP (2012). Sistemas renal y urinario. En *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Pp. 8.2-8.10.
54. Henrich, W. L., & Levi, M. (1991). Ontogeny of renal renin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *The American journal of physiology*, 260(4 Pt 2), F530–F535.
55. Hinojos, C. A., & Doris, P. A. (2004). Altered subcellular distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in proximal tubules in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 44(1), 95–100.
56. Huang, Y., Noble, N. A., Zhang, J., Xu, C., & Border, W. A. (2007). Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney international*, 72(1), 45–52.
57. Huang, Y., Wongamorntham, S., Kasting, J., McQuillan, D., Owens, R. T., Yu, L., Noble, N. A., & Border, W. (2006). Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney international*, 69(1), 105–113.
58. Huby, A. C., Rastaldi, M. P., Caron, K., Smithies, O., Dussaule, J. C., & Chatziantoniou, C. (2009). Restoration of podocyte structure and improvement of chronic renal disease in transgenic mice overexpressing renin. *PLoS one*, 4(8), e6721.
59. Hultström M. (2012). Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, 30(6), 1087–1091.
60. Ifeanyichukwu Ogobuiro, Faiz Tuma (2022). Renal Physiology. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

61. Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y., & Tanabe, T. (1995). Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *The Journal of biological chemistry*, 270(42), 24965–24971.
62. Jackson EK (2012). Renina y angiotensina. En: Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12° ed. Mc Graw Hill, pp. 789-821.
63. Jia, Z., Zhang, A., Zhang, H., Dong, Z., & Yang, T. (2006). Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 increases sensitivity to salt loading and angiotensin II infusion. *Circulation research*, 99(11), 1243–1251.
64. Jirout, M. L., Friese, R. S., Mahapatra, N. R., Mahata, M., Taupenot, L., Mahata, S. K., Kren, V., Zídek, V., Fischer, J., Maatz, H., Ziegler, M. G., Pravenec, M., Hubner, N., Aitman, T. J., Schork, N. J., & O'Connor, D. T. (2010). Genetic regulation of catecholamine synthesis, storage and secretion in the spontaneously hypertensive rat. *Human molecular genetics*, 19(13), 2567–2580.
65. Jo, Y. I., Cheng, H., Wang, S., Moeckel, G. W., & Harris, R. C. (2007). Puromycin induces reversible proteinuric injury in transgenic mice expressing cyclooxygenase-2 in podocytes. *Nephron. Experimental nephrology*, 107(3), e87–e94.
66. Johnson, R. J., Lanasa, M. A., Gabriela Sánchez-Lozada, L., & Rodriguez-Iturbe, B. (2015). The discovery of hypertension: evolving views on the role of the kidneys, and current hot topics. *American journal of physiology. Renal physiology*, 308(3), F167–F178.
67. Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Takemitsu, T., Sakoda, M., Suzuki, F., Nakagawa, T., Hayashi, M., & Inagami, T. (2006). Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney international*, 70(4), 641–646.
68. Kitching, A. R., & Hutton, H. L. (2016). The Players: Cells Involved in Glomerular Disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 11(9), 1664–1674.
69. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., & Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews*, 59(3), 251–287.

70. Krop, M., Lu, X., Danser, A. H., & Meima, M. E. (2013). The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned?. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 465(1), 87–97.
71. Kundu S, Rao JP (2008). The story of spontaneously hypertensive rat (SHR): A Review. *Al Ameen J Med Sci* 1(1):65-66
72. Lahera JV y Diaz C (2009). Homeostasis de la presión arterial. *Nefrología clínica*. 3ª ed Edit Medica Panamericana. Pag 214.
73. LaPointe, M. S., Sodhi, C., Sahai, A., & Batlle, D. (2002). Na⁺/H⁺ exchange activity and NHE-3 expression in renal tubules from the spontaneously hypertensive rat. *Kidney international*, 62(1), 157–165.
74. Larsen, H. E., Bardsley, E. N., Lefkimmiatis, K., & Paterson, D. J. (2016). Dysregulation of Neuronal Ca²⁺ Channel Linked to Heightened Sympathetic Phenotype in Prohypertensive States. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(33), 8562–8573.
75. Lee, H., Abe, Y., Lee, I., Shrivastav, S., Crusan, A. P., Hüttemann, M., Hopfer, U., Felder, R. A., Asico, L. D., Armando, I., Jose, P. A., & Kopp, J. B. (2014). Increased mitochondrial activity in renal proximal tubule cells from young spontaneously hypertensive rats. *Kidney international*, 85(3), 561–569.
76. Lee, S. K., Arunkumar, S., Sirajudeen, K. N., & Singh, H. J. (2010). Glutathione system in young spontaneously hypertensive rats. *Journal of physiology and biochemistry*, 66(4), 321–327.
77. Li, M., & Batuman, V. (2009). Vitamin D: a new hope for chronic kidney disease?. *Kidney international*, 76(12), 1219–1221.
78. Li, S., Cheng, S., Sun, Z., Mungun, H. K., Gong, W., Yu, J., Xia, W., Zhang, Y., Huang, S., Zhang, A., & Jia, Z. (2016). Indoxyl Sulfate Induces Mesangial Cell Proliferation via the Induction of COX-2. *Mediators of inflammation*, 2016, 5802973.
79. Lin, X., Suh, J. H., Go, G., & Miner, J. H. (2014). Feasibility of repairing glomerular basement membrane defects in Alport syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25(4), 687–692.

80. Lopes de Faria, J. B., Zoukhri, D., & Lorenzi, M. (1997). Mesangial cell abnormalities in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. *Kidney international*, 52(2), 387–392.
81. López-Hernández, F. J., & López-Novoa, J. M. (2012). Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and tissue research*, 347(1), 141–154.
82. Macconi, D., Remuzzi, G., & Benigni, A. (2014). Key fibrogenic mediators: old players. *Renin-angiotensin system. Kidney international supplements*, 4(1), 58–64.
83. MacKay, K., Striker, L. J., Stauffer, J. W., Agodoa, L. Y., & Striker, G. E. (1990). Relationship of glomerular hypertrophy and sclerosis: studies in SV40 transgenic mice. *Kidney international*, 37(2), 741–748.
84. Marín, R., Gorostidi, M., & Díez Ojea, B. (2010). Nefroangiosclerosis. La Cenicienta de la enfermedad renal crónica [Nephrosclerosis. The Cinderella of chronic kidney disease]. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 30(3), 275–279.
85. Martín, A., Pérez-Girón, J. V., Hernanz, R., Palacios, R., Briones, A. M., Fortuño, A., Zalba, G., Salices, M., & Alonso, M. J. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *Journal of hypertension*, 30(2), 315–326.
86. Mazzei, L., García, M., Calvo, J. P., Casarotto, M., Fornés, M., Abud, M. A., Cuello-Carrión, D., Ferder, L., & Manucha, W. (2016). Changes in renal WT-1 expression preceding hypertension development. *BMC nephrology*, 17, 34.
87. Menke, A. L., & Schedl, A. (2003). WT1 and glomerular function. *Seminars in cell & developmental biology*, 14(4), 233–240.
88. Mennuni, S., Rubattu, S., Pierelli, G., Tocci, G., Fofi, C., & Volpe, M. (2014). Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *Journal of human hypertension*, 28(2), 74–79.
89. Miner J. H. (2011). Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 26(9), 1413–1417.

90. Müller, D. N., & Luft, F. C. (2006). Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 1(2), 221–228.
91. Namsolleck, P., Recarti, C., Foulquier, S., Steckelings, U. M., & Unger, T. (2014). AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Current hypertension reports*, 16(2), 416.
92. Nasrallah, R., Clark, J., & Hébert, R. L. (2007). Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clinical science (London, England: 1979)*, 113(7), 297–311.
93. Nguyen, G., & Muller, D. N. (2010). The biology of the (pro)renin receptor. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(1), 18–23.
94. Nijenhuis, T., Sloan, A. J., Hoenderop, J. G., Flesche, J., van Goor, H., Kistler, A. D., Bakker, M., Bindels, R. J., de Boer, R. A., Möller, C. C., Hamming, I., Navis, G., Wetzels, J. F., Berden, J. H., Reiser, J., Faul, C., & van der Vlag, J. (2011). Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *The American journal of pathology*, 179(4), 1719–1732.
95. Nogueira, A., Pires, M. J., & Oliveira, P. A. (2017). Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In vivo (Athens, Greece)*, 31(1), 1–22.
96. Ogobuiro, I., & Tuma, F. (2021). *Physiology, Renal*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
97. Padda, R. S., Shi, Y., Lo, C. S., Zhang, S. L., & Chan, J. S. (2015). Angiotensin-(1-7): A Novel Peptide to Treat Hypertension and Nephropathy in Diabetes? *Journal of diabetes & metabolism*, 6(10), 10.4172/2155-6156.1000615.
98. Patel, V. B., Zhong, J. C., Grant, M. B., & Oudit, G. Y. (2016). Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circulation research*, 118(8), 1313–1326.
99. Perrone, M. G., Scilimati, A., Simone, L., & Vitale, P. (2010). Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Current medicinal chemistry*, 17(32), 3769–3805.
100. Peti-Peterdi, J., & Harris, R. C. (2010). Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(7), 1093–1096.

101. Pinheiro, S. V., & Simões E Silva, A. C. (2012). Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. *International journal of hypertension*, 2012, 414128.
102. Pinto, Y. M., Paul, M., & Ganten, D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular research*, 39(1), 77–88.
103. Prabhakaran, D., δ Anad, S.S. (2003). Selective COX-2 inhibition endothelial function in coronary artery disease. Chenevard R, Hurlimann D, Bechir M et al *Circulation* 2003; 107: 405-09. *Vascular medicine (London, England)*, 8(1), 63–64.
104. Qi, Z., Hao, C. M., Langenbach, R. I., Breyer, R. M., Redha, R., Morrow, J. D., & Breyer, M. D. (2002). Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *The Journal of clinical investigation*, 110(1), 61–69.
105. Querfeld, U., Mak, R. H., & Pries, A. R. (2020). Microvascular disease in chronic kidney disease: the base of the iceberg in cardiovascular comorbidity. *Clinical science (London, England: 1979)*, 134(12), 1333–1356.
106. Richter, K., & Kietzmann, T. (2016). Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell and tissue research*, 365(3), 591–605.
107. Rusai, K., Jianxing, C., Schneider, R., Struijker-Boudier, H., Lutz, J., Heemann, U., & Baumann, M. (2011). Renin inhibition mitigates anti-angiogenesis in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, 29(2), 266–272.
108. Rüster, C., & Wolf, G. (2006). Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(11), 2985–2991.
109. Rodríguez-Iturbe, B., Ferrebuz, A., Vanegas, V., Quiroz, Y., Mezzano, S., & Vaziri, N. D. (2005). Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(1), 51–57.
110. Seccia, T. M., Caroccia, B., & Calò, L. A. (2017). Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms. *Journal of hypertension*, 35(2), 205–212.
111. Shankland S. J. (2006). The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney international*, 69(12), 2131–2147.

112. Shanks, J., Manou-Stathopoulou, S., Lu, C. J., Li, D., Paterson, D. J., & Herring, N. (2013). Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 305(7), H980–H986.
113. Schlöndorff, D., & Banas, B. (2009). The mesangial cell revisited: no cell is an island. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(6), 1179–1187.
114. Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, 56(3), 387–437.
115. Singh, M. V., Chapleau, M. W., Harwani, S. C., & Abboud, F. M. (2014). The immune system and hypertension. *Immunologic research*, 59(1-3), 243–253.
116. Siragy H. M. (2000). The role of the AT2 receptor in hypertension. *American journal of hypertension*, 13(5 Pt 2), 62S–67S.
117. Smyth EM, Burke A, FitzGerald (2012). Autacoides derivados de lípidos: Eicosanoides y factor activador plaquetario. En: Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12° ed. Mc Graw Hill, pp. 653-669.
118. Steege, A., Fähling, M., Paliege, A., Bondke, A., Kirschner, K. M., Martinka, P., Kaps, C., Patzak, A., Persson, P. B., Thiele, B. J., Scholz, H., & Mrowka, R. (2008). Wilms' tumor protein (-KTS) modulates renin gene transcription. *Kidney international*, 74(4), 458–466.
119. Stitt-Cavanagh, E. M., Faour, W. H., Takami, K., Carter, A., Vanderhyden, B., Guan, Y., Schneider, A., Breyer, M. D., & Kennedy, C. R. (2010). A maladaptive role for EP4 receptors in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(10), 1678–1690.
120. Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W. J., Mestre, J. R., Sampat, A., & Dannenberg, A. J. (1999). Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *The Journal of biological chemistry*, 274(16), 10911–10915.
121. Suganami, T., Mori, K., Tanaka, I., Mukoyama, M., Sugawara, A., Makino, H., Muro, S., Yahata, K., Ohuchida, S., Maruyama, T., Narumiya, S., & Nakao, K. (2003). Role of prostaglandin E receptor EP1 subtype in the development of renal injury in genetically hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 42(6), 1183–1190.
122. Sutariya, B., Jhonsa, D., & Saraf, M. N. (2016). TGF- β : the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 38(1), 39–49.

123. Swan, C. E., & Breyer, R. M. (2011). Prostaglandin E2 modulation of blood pressure homeostasis: studies in rodent models. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 96(1-4), 10–13.
124. Swan, S. K., Rudy, D. W., Lassetter, K. C., Ryan, C. F., Buechel, K. L., Lambrecht, L. J., Pinto, M. B., Dilzer, S. C., Obrda, O., Sundblad, K. J., Gumbs, C. P., Ebel, D. L., Quan, H., Larson, P. J., Schwartz, J. I., Musliner, T. A., Gertz, B. J., Brater, D. C., & Yao, S. L. (2000). Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in elderly persons receiving a low-salt diet. A randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine*, 133(1), 1–9.
125. Tan, Z. Y., Lu, Y., Whiteis, C. A., Simms, A. E., Paton, J. F., Chapleau, M. W., & Abboud, F. M. (2010). Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. *Circulation research*, 106(3), 536–545.
126. Tikellis, C., Cooper, M. E., Bialkowski, K., Johnston, C. I., Burns, W. C., Lew, R. A., Smith, A. I., & Thomas, M. C. (2006). Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension? *Kidney international*, 70(1), 34–41.
127. Touyz, R. M., & Briones, A. M. (2011). Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 34(1), 5–14.
128. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., & Margioris, A. N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase 2. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(10), 1654–1661.
129. Uyehara, C. F., & Gellai, M. (1993). Impairment of renal function precedes establishment of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *The American journal of physiology*, 265(4 Pt 2), R943–R950.
130. Vanhoutte P. M. (2009). COX-1 and vascular disease. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 86(2), 212–215.
131. Vázquez-Cruz, B., Rangel-Veladiz, J., Segura-Cobos, D., López-Sánchez, P., Ibarra-Barajas, M., & Amato, D. (2013). Effect of Cyclooxygenase-2 Blockade on Renal Hypertrophy Development during Early Diabetes Mellitus. *Pharmacology & Pharmacy*, 04, 288-295.

132. Vázquez Vigoa A, Álvarez Santana R, Cruz Álvarez NM, Fernández Arias M, Méndez Rosabal A, Vázquez Cruz A (2009). High blood pressure as a cause of chronic renal disease using autopsy protocols studies. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*. 21(1):17-22.
133. Wang, J. L., Cheng, H. F., & Harris, R. C. (1999). Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 34(1), 96–101.
134. Wang, J. L., Cheng, H. F., Shappell, S., & Harris, R. C. (2000). A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. *Kidney international*, 57(6), 2334–2342.
135. Weichert, W., Paliege, A., Provoost, A. P., & Bachmann, S. (2001). Upregulation of juxtaglomerular NOS1 and COX-2 precedes glomerulosclerosis in fawn-hooded hypertensive rats. *American journal of physiology. Renal physiology*, 280(4), F706–F714.
136. Wolf G. (2002). Angiotensin II and tubular development. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17 Suppl 9, 48–51.
137. Wolf G. (2006). Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney international*, 70(11), 1914–1919.
138. Wolley MJ, Stowasser M. Resistant hypertension and chronic kidney disease: a dangerous liaison. *Curr Hypertens Rep*. 2016, 18(5):36.
139. Wong, W. T., Tian, X. Y., Chen, Y., Leung, F. P., Liu, L., Lee, H. K., Ng, C. F., Xu, A., Yao, X., Vanhoutte, P. M., Tipoe, G. L., & Huang, Y. (2010). Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circulation research*, 107(8), 984–991.
140. Xu, T., Wang, N. S., Fu, L. L., Ye, C. Y., Yu, S. Q., & Mei, C. L. (2012). Celecoxib inhibits growth of human autosomal dominant polycystic kidney cyst-lining epithelial cells through the VEGF/Raf/MAPK/ERK signaling pathway. *Molecular biology reports*, 39(7), 7743–7753.
141. Yang, G. X., Xu, Y. Y., Fan, Y. P., Wang, J., Chen, X. L., Zhang, Y. D., & Wu, J. H. (2014). A maladaptive role for EP4 receptors in mouse mesangial cells. *PLoS one*, 9(8), e104091.
142. Yang T. (2007). Microsomal prostaglandin E synthase-1 and blood pressure regulation. *Kidney international*, 72(3), 274–278.

143. Yang, T., Singh, I., Pham, H., Sun, D., Smart, A., Schnermann, J. B., & Briggs, J. P. (1998). Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *The American journal of physiology*, 274(3), F481–F489.
144. Yao, J., Oite, T., & Kitamura, M. (2009). Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(5), F939–F946.
145. Ye, W., Zhang, H., Hillas, E., Kohan, D. E., Miller, R. L., Nelson, R. D., Honeggar, M., & Yang, T. (2006). Expression and function of COX isoforms in renal medulla: evidence for regulation of salt sensitivity and blood pressure. *American journal of physiology. Renal physiology*, 290(2), F542–F549.
146. Yu, Y., Stubbe, J., Ibrahim, S., Song, W. L., Smyth, E. M., Funk, C. D., & FitzGerald, G. A. (2010). Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation and blood pressure homeostasis: targeted exchange of cyclooxygenase isoforms in mice. *Circulation research*, 106(2), 337–345.
147. Yuhki, K., Kojima, F., Kashiwagi, H., Kawabe, J., Fujino, T., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2011). Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacology & therapeutics*, 129(2), 195–205.
148. Zhang, J., Ding, E. L., & Song, Y. (2006). Adverse effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on renal and arrhythmia events: meta-analysis of randomized trials. *JAMA*, 296(13), 1619–1632.

10. APÉNDICES

10.1 Apéndice I. (Soluciones)

SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA LIBRE DE CALCIO Y MAGNESIO

NaCl 8.09 g.

KCl 0.2 g.

Na₂ HPO₄ 1.15 g.

Se disolvieron en 1L de agua.

PBS (Amortiguador de fosfatos)

NaCl 137 mM 8 g.

KCl 2,7 mM 0.2 g.

Na₂ HPO₄ 10 mM 1.44 g.

KH₂ PO₄ 2 mM 0.24 g.

Se disolvieron en 1L de agua.

ANTIBIÓTICO

Penicilina con glutamina de Gibco. No. Catalogo 10378-016 (1000 U/ml)

SUERO BOVINO FETAL LAVADO

Agregar al Suero bovino fetal carbón activado al 1% agitando toda la noche, luego centrifugar para precipitar el carbón.

AMORTIGUADOR DE GLICINA.

Glicina 0.2 M en agua destilada, ajustar el pH a 2.0 con HCl.

ALCOHOL ÁCIDO

Etanol al 70% en amortiguador de Glicina.

PORTAOBJETOS TRATADOS CON POLI-L-LISINA.

Se diluye en proporción 1:10 solución de Poli-L-Lisina de Sigma al 0.1% y se sumergen los portaobjetos que se limpian con alcohol-ácido por 5 minutos

11.2 Apéndice II (Técnicas)

TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

Los cortes histológicos Se desparafinaron y se rehidrataron con xilol y pases en concentraciones descendentes de etanol de 100%, 96%, 80%, 50% y agua destilada. Posteriormente se sumergieron en hematoxilina de Mayer por 5-10 min y en agua corriente 15 min. Se hizo la diferenciación por 0.5 a 2 min en eosina al 0.2 % en H₂O y se sumergieron en agua destilada para después deshidratar con etanol 96° por 20 seg, en etanol absoluto 2x3 min y en xileno 2x10 min. La laminilla se cubrió con resina entellan y un cubreobjetos.

TINCIÓN TRICROMICA DE MASSON.

Se rehidrataron las laminillas como en el caso de la tinción de HyE y se sumergieron en solución de Bouin, durante 24 h a temperatura ambiente o 1 h a 56 - 60 °C, se pasaron 3 veces por 3 min en H₂O destilada y por 5 min en hematoxilina férrica de Weigert, a continuación, se sumergieron 5 min en agua corriente para diferenciación, 3 min lavado en H₂O destilada. 5 min en fucsina-escarlata, 2 min lavado en H₂O destilada. 15 min en ácido fosfomolibdico al 5% en agua destilada y 10 min en verde luz al 2 %. Posteriormente se colocaron en agua destilada para hacer la diferenciación con ácido acético al 1% en H₂O destilada.

Se hizo un deshidratado rápido, unos segundos, en etanol de graduación creciente: 80°, 96° y 100° 2 veces por 10 min en xileno, para finalmente realizar el montaje de la muestra con medio de montaje entellan.

La evaluación patológica de las laminillas se realizó en al menos 6 animales por grupo en los cuales se analizaron cambios en la estructura del glomérulo y de los túbulos renales, así como se identificó la presencia de fibrosis.

También se evaluó la hipertrofia de los glomérulos para lo cual se midió el área de 50 glomérulos por cada animal con el programa ZEN (Carl Zeiss, Alemania).

TINCIÓN DE ÁCIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS).

Las laminillas se rehidrataron como se describió previamente para las otras tinciones y se colocaron en ácido peryódico al 0.5 % durante 5 min, lo que permite oxidar las uniones carbono-carbono de los azúcares para formar grupos aldehídos y posteriormente se hicieron varios lavados en H₂O destilada. Las laminillas se colocaron en la solución de reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad. Los grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (ácido sulfuroso con fucsina) resultando en un color rojo fucsia. Las secciones quedan de un color rosado intenso.

Se puede dar un paso con una solución de metabisulfito potásico (o sódico) durante 2 minutos para eliminar los residuos de reactivo de Schiff de la muestra.

Las laminillas se lavaron durante 5 min en agua corriente y varios lavados en H₂O destilada. Los núcleos se contratiñeron por 5 min en hematoxilina de Mayer y 15 min en agua corriente, para finalmente deshidratar en soluciones de etanol de concentración ascendente, etanol absoluto y xilol. Se montaron con resina entellan y se evaluaron en microscopio óptico.

INMUNOHISTOQUÍMICA DE COX-2 y RENINA.

Para realizar la detección inmunológica de las proteínas los cortes histológicos se rehidrataron y se realizó la recuperación antigénica por 1 min en olla de presión en buffer de citratos, posteriormente se realizaron 3 lavados colocaron en vasos coplin con PBS durante 5 min y se permeabilizó por 15 min en tritón X100 al 0.25% en PBS, se lavó nuevamente con PBS y se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con glicina 0.1 M en PBS por 1 h, para después incubar con un anticuerpo anti-COX-

2, anti-renina ó anticuerpo anti caspasa 3 activa en una dilución 1:100 a temperatura ambiente por 12 horas, se lavó con PBS y se incubó con anticuerpo secundario acoplado a FITC anti-IgG de conejo o anti-IgG de cabra según corresponda, finalmente se incubó con yoduro de propidio para marcaje de núcleos y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (vectashield) para observar en Microscopio de Fluorescencia (Carl Zeiss).

“WESTERN BLOT”.

Se utilizó un sistema de geles discontinuos con un gel separador del 14 %. Las muestras de corteza renal se ajustaron a 1 mg/mL con agua purificada y se trataron con amortiguador RIPA tratadas posteriormente con solución de tratamiento (tris-HCl 0,1 M pH 6,8, β mercaptoetanol 1 %, SDS 2 %, glicerol 0,1 %, bromofenol azul 0,1 %) en una relación 1:1. Se calentaron a 100 °C durante 5 min. Se aplicaron 10 μ L y se efectuó la corrida a 35 mA, 200 V y 60 Watt durante 1 h. Una vez concluida la electroforesis, se continuó con los pasos establecidos para el desarrollo de la técnica del Western Blot. Las proteínas sin teñir se transfirieron a una membrana de PVDF a 350 mA durante 2 h con una solución tris 0,02 mol/L glicina 0,15 mol/L SDS 0,1 % pH 8,3.

El bloqueo se efectuó con leche descremada al 3 % en solución fosfato (fosfato sodio dibásico 0,08 mol/L, cloruro de sodio 1,37 mol/L, dihidrógeno fosfato de potasio 0,015 mol/L, cloruro de potasio 0,27 mol/L pH 7,2) diluido 10 veces, durante 1 h a 37 °C. Luego de los lavados con el mismo buffer diluido 1/10 se incubó con los anticuerpos monoclonales (anti renina y anti COX-2) diluidos en solución de leche descremada al 1,5 % en solución fosfato (1/10) tween 20 0,1 %. Se repiten los lavados y posteriormente se incubó por espacio de 2 h en una solución de leche descremada 1,5 % con el conjugado adecuado, conjugado anti IgG ratón-peroxidasa. Se reveló con el sistema diaminobencidina (DAB)-H₂O₂ y el patrón de PM biotinilado se reveló con el conjugado avidin-horseradish peroxidasa.

PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Fragmentos de corteza renal de 1mm³ se fijaron en paraformaldehído al 4% con glutaraldehido 2.5% en PBS por 1 h 30 min. Se lavó el tejido en el mismo amortiguador 3 veces por 15 minutos y se postfijó con tetraóxido de osmio al 1% en PBS, para posteriormente deshidratar con

concentraciones graduales de etanol desde 30% hasta etanol absoluto 10 minutos cada uno y dos cambios de óxido de propileno como intermediario de 10 minutos cada uno, se realizó la preinclusión de las muestras en resina epoxica EPON 812 en una mezcla 1:1 en óxido de propileno 24 horas y se cambió a una mezcla 2:1 por 24 horas, finalmente se incluyó el tejido en resina pura 1 hora y se polimerizo a 60°C por 24 horas. Se obtuvieron cortes semifinos para observar en microscopio óptico que se tiñeron con azul de toluidina al 1% y cortes ultrafinos que se montaron en rejillas de cobre cubiertas con formvar para contrastar con acetato de uranilo alcohólico al 8%, acetato de uranilo acuoso al 4% y citrato de plomo al 0.035% 10 minutos cada uno y se observó en microscopio electrónico de transmisión.

11. ANEXO (ARTÍCULO DE REQUISITO).

Original Article

Morphology and cyclooxygenase-2 and renin expression in the kidney of young spontaneously hypertensive rats

Veterinary Pathology
1-14
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/03009858211052663
journals.sagepub.com/home/vet



Carmen G. Mondragón-Huerta¹, Rocío Bautista-Pérez²,
Luis A. Baiza-Gutman¹, María L. Escobar-Sánchez³,
Leonardo Del Valle-Mondragón², Carlos Gerardo Salas-Garrido³,
Patricia Castro-Moreno¹, and Maximiliano Ibarra-Barajas¹

Abstract

The kidneys play an important role in blood pressure regulation under normal and pathological conditions. We examined the histological changes and expression patterns of cyclooxygenase-2, renin, and (pro)renin receptor (PRR) in the renal cortex of prehypertensive spontaneously hypertensive rats (SHRs) and Wistar Kyoto rats (WKYs). Moreover, blood pressure and plasma urea, creatinine, angiotensin II, and angiotensin (1–7) levels were measured. The results showed that both strains had similar blood pressure and plasma urea and creatinine levels. The glomerular area, basement membrane thickness, collagen fiber content, and arterial wall thickness were greater in SHRs than in WKYs. By immunohistochemistry, cyclooxygenase-2 was localized in the macula densa and renal tubules of both strains. In SHRs, cyclooxygenase-2 was detected in a larger number of tubules, and the cortical expression of cyclooxygenase-2 was also increased. In both strains, PRR and renin were localized in the tubular epithelium and juxtaglomerular cells, respectively. In SHRs, PRR immunolocalization was increased in the glomerulus. The cortical expression of immature renin was markedly increased in SHRs compared to that in WKYs, while renin was significantly decreased. These changes were associated with higher plasma angiotensin II levels and lower plasma angiotensin (1–7) levels in SHRs. The results indicate that the kidneys of SHRs showed morphological changes and variations in cortical expression patterns of PRR, cyclooxygenase-2, and renin before the development of hypertension.

Keywords

COX-2, hypertension, kidney, morphological changes, prehypertensive SHR, PRR, RAS, rat, renin

Primary arterial hypertension is a common disease in humans with a significant impact on public health due to its associated complications, such as stroke, vascular injury, heart failure, and kidney disease.¹⁰ This disorder has been widely studied in animal models of hypertension, such as spontaneously hypertensive rats (SHRs).⁴⁸ Several researchers have reported renal structural and functional changes in the prehypertensive stages of SHR, including renal interstitial fibrosis and decreases in glomerular filtration rates.^{25,41,58} In addition, the renal weight/body weight ratio was decreased in 4-week-old prehypertensive SHRs, and fewer nephrons were found in the kidneys of SHRs than in Wistar Kyoto rats (WKYs) at birth.^{5,41,58}

In different hypertension models, one of the most important regulatory pathways is the renin-angiotensin system (RAS).^{13,32} Angiotensin II (Ang II) and its receptor AT₁ are increased in prehypertensive SHRs.^{7,9} In addition, there is evidence that Ang II promotes renal inflammatory processes, since the administration of an AT₁ blocker prevents the increase in inflammatory markers in prehypertensive SHRs.²³ In the

renovascular hypertension model, a high Ang II level was found in the serum and was related to renal alterations, such as hypertrophic vessels, podocyte effacement, albuminuria, and glomerulus extracellular matrix accumulation.⁶

In contrast, the contribution of cyclooxygenase-2 (COX-2) to renal physiology in prehypertensive SHRs has not been well documented. The COX isoforms (COX-1 and COX-2) are responsible for the production of prostanoids that play multiple

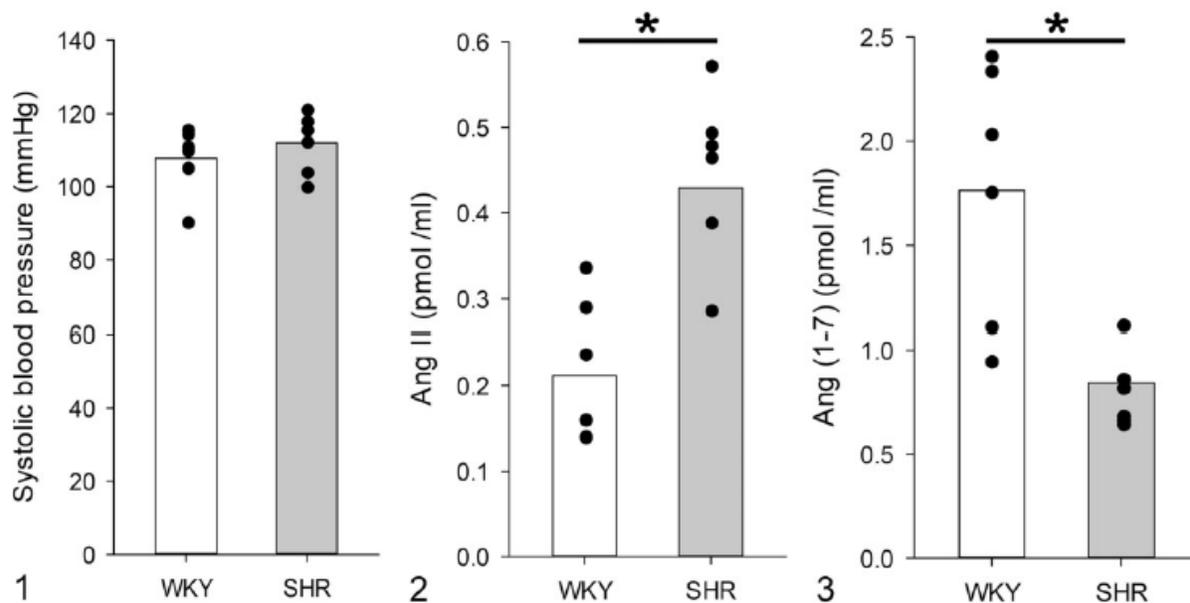
¹Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalneantla, Estado de México, México

²Instituto Nacional de Cardiología, "Dr. Ignacio Chávez," Ciudad de México, México

³Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Corresponding Author:

Maximiliano Ibarra Barajas, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalneantla, Estado de México 54090, México. Email: maxibarrab@hotmail.com



Figures 1–3. Systolic blood pressure and plasma angiotensin II (Ang II) and angiotensin (1–7) (Ang (1–7)) levels in Wistar Kyoto rats (WKYs; white bars) and spontaneously hypertensive rats (SHR; gray bars). **Figure 1.** Systolic blood pressure evaluated by barometric plethysmography. There are no differences between WKY and SHR. **Figure 2.** Plasma Ang II level by capillary zone electrophoresis. There is a higher amount of Ang II in SHR compared to that in WKY. **Figure 3.** Plasma Ang (1–7) level by capillary zone electrophoresis. The plasma Ang (1–7) levels are lower in SHR compared to that in WKY. The graphs represent the means and the individual data (points). $N = 6$, $*P < .05$.

roles in the kidney, such as vascular tone regulation, glomerular filtration maintenance, and sodium and water regulation.²¹ The contribution of COX-2 to renal alterations has been shown in the renovascular hypertension 2-kidney 1-clip model⁴⁹ in which COX-2 expression was upregulated in association with interstitial fibrosis, and treatment with the COX-2-specific inhibitor celecoxib reduced this effect. It is unknown whether (pro)renin receptor (PRR), COX-2, and renin are altered prior to blood pressure increase in SHRs, which would suggest the involvement of these pathways in the development of early renal structural changes in SHRs. This study examined renal morphological and functional changes and the cortical expression of PRR, COX-2, and renin in prehypertensive SHRs.

Materials and Methods

Experiments were performed on 6-week-old male SHR/NCrI (SHR) and WKY/NCrI (WKY) rats (70–100 g body weight; Charles River Laboratories) provided by the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The rats were housed at a controlled temperature ($20 \pm 4^\circ\text{C}$) and exposed to a daily 12-hour light–dark cycle, with free access to normal rat chow and tap water. The animals were handled in accordance with the Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA,

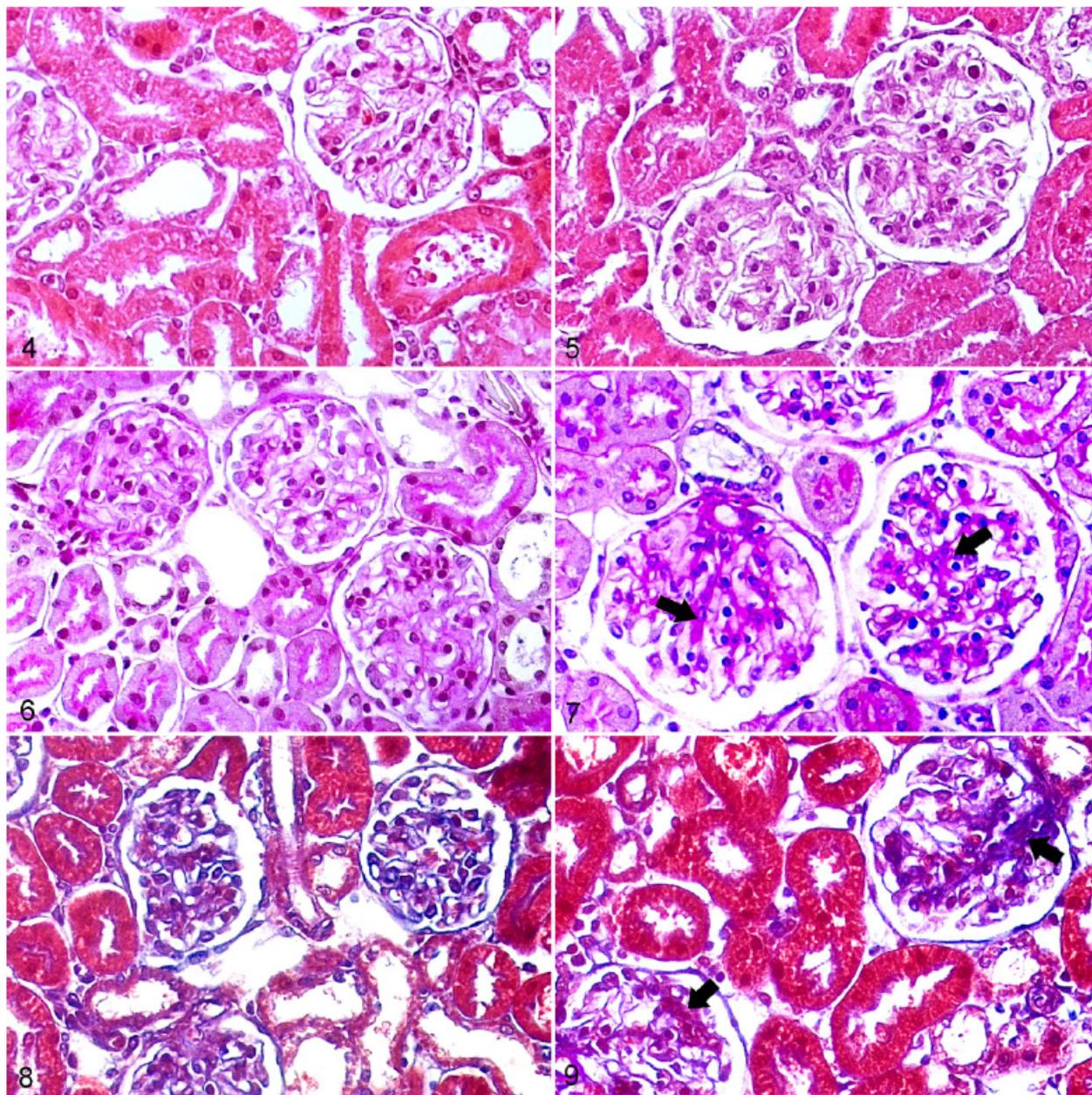
México), and all experimental procedures were approved by the Institutional Bioethics and Investigation Committee (No. 1022).

Arterial Pressure Measurements

Systolic arterial blood pressure was measured noninvasively in conscious rats using a tail-cuff computer-aided monitoring device (Automatic Blood Pressure Computer, Model LE 5007; Letica Scientific Instruments) according to a previously described procedure.⁷ Briefly, the rats were restrained in a plastic container (size-matched), while a sensor and ring containing inflatable latex were placed in the tail. The rats were kept warm in the same device (37°C). All animals were trained to be inside the container, the cuff was placed on the tail, and the latex ring was inflated and deflated (this step was performed several times a week). The blood pressures of the rats were recorded. The mean of 4 measurements was used to determine the blood pressure of each rat.

Plasma Urea and Creatinine Levels

For plasma urea and creatinine determination, blood was collected on the same day as euthanasia. The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneally),



Figures 4–9. Kidney, Wistar Kyoto rats (WKY; Figs. 4, 6, 8) and spontaneously hypertensive rats (SHR; Figs. 5, 7, 9). **Figure 4.** WKY. Normal histologic structure of the renal cortex. Hematoxylin and eosin (HE). **Figure 5.** SHR. Glomerular hypertrophy. HE. **Figure 6.** WKY. Periodic acid-Schiff (PAS). **Figure 7.** SHR. Accumulation of extracellular matrix in glomeruli (arrows). PAS. **Figure 8.** WKY. Masson's trichrome (MT). **Figure 9.** SHR. Diffuse sclerosis of glomerular capillaries (arrows). MT.

and blood samples were obtained via aortic puncture and treated with heparin (500 μ L/mL; Sigma-Aldrich). The samples were centrifuged (Sovall RT6000D, rotor H1000B; DuPont) at 1879 g for 10 minutes at 4 °C. The urea and creatinine levels in the plasma samples were determined using an automated process on the IL-300 Plus Chemistry Analyzer (Diamond Diagnostics Holliston).

Plasma Ang II and Ang (1–7) Levels

The plasma samples were incubated with a protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Roche Diagnostics) to prevent the exogenous generation of angiotensin and then immediately preserved at –70 °C until use. The plasma was deproteinized with methanol (Sigma-Aldrich) at a ratio of 10:1 (v/v) and

centrifuged at 16 000g for 10 minutes at 4 °C (Sorvall RC-28S, Rotor F50L; DuPont). The pellet was discarded, and the supernatant was deproteinized by the addition of 5% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich), homogenized, and centrifuged at 16 000g (Sorvall RC-28s, Rotor F50L; DuPont) for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was filtered through a 0.22- μ m nitrocellulose membrane filter (Millipore) and diluted 1:10 with 0.1 M NaOH (Sigma-Aldrich). The sample (2.0 mL) was passed through a Sep-Pak Classic C-18 cartridge (Waters Corporation), and then 100 μ L of the final filtered sample was employed for the analysis. Ang II and Ang (1–7) were detected and quantified simultaneously using capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection with a photodiode array at a wavelength of 200 nm, as previously described.⁵⁶ The analysis was performed using a P/ACE MDQ system equipped with ultraviolet-photodiode array detection (Beckman Coulter Inc) and controlled by 32 Karat Software version 7.0 (Beckman Coulter Inc). Ang II and Ang (1–7) levels were determined using standard curves.

Histopathological Studies

The kidneys were exposed and prepared for the perfusion. Briefly, after midline laparotomy, the aortic artery was cannulated and both kidneys were removed and perfused with cold phosphate-buffered saline (PBS) at a pH of 7.4 and at a constant flow rate of 10 mL/min at 4 °C to remove the blood cells. All histopathological examinations were performed using standard laboratory procedures. The kidney cortex was fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, transferred to PBS and 70% ethanol, and then processed with a graded series of ethanol solutions and xylol. The tissues were subsequently embedded in paraffin and serially sectioned (4 μ m thick). The sections were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid–Schiff stain (PAS), Masson trichrome stain, and reticular fiber silver stain for histological examination. The sections were evaluated in a double-blind manner by a histopathologist using the image analysis software ZEN 2.1 Lite (Carl Zeiss Microscopy). The microphotographs were captured at 63 \times magnification.

Electron Microscopy

Pieces of the kidney cortex were fixed in 2.5% glutaraldehyde–4% formaldehyde in PBS at pH 7.2 for 2 hours and then post-fixed in 1% osmium tetroxide in PBS buffer for 1 hour. Tissues were dehydrated using a graded series of ethanol and embedded in EPON (Embed 812, Electron Microscopy Sciences). The areas used for thin sections were selected from the semi-thin sections stained with toluidine blue. The grids were counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Ultrathin sections were evaluated at various magnifications in 3 randomly selected animals per group. The thickness of the glomerular basement membrane (GBM) was measured in electron micrographs obtained at 12 000 \times and 25 000 \times magnification under a JEOL 1010 electron microscope operated at 60 kV and the image analysis software ZEN 2.1 Lite (Carl Zeiss Microscopy).

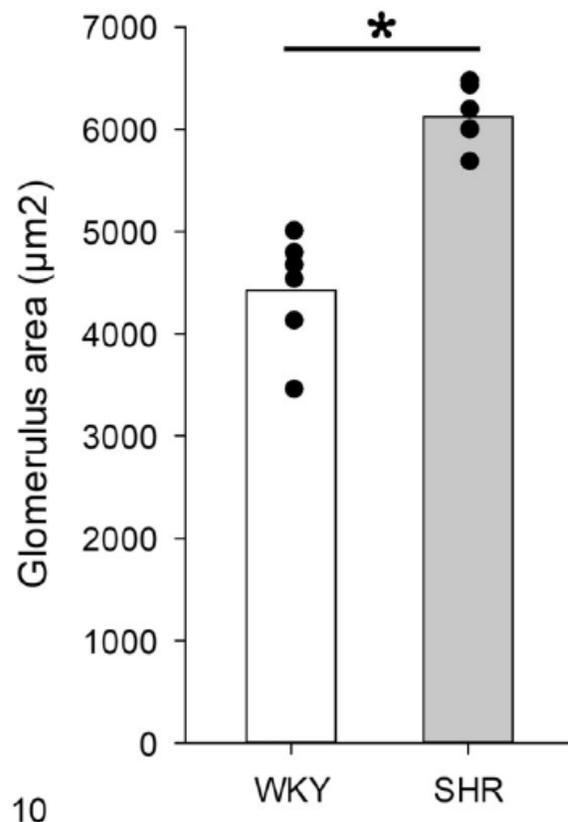
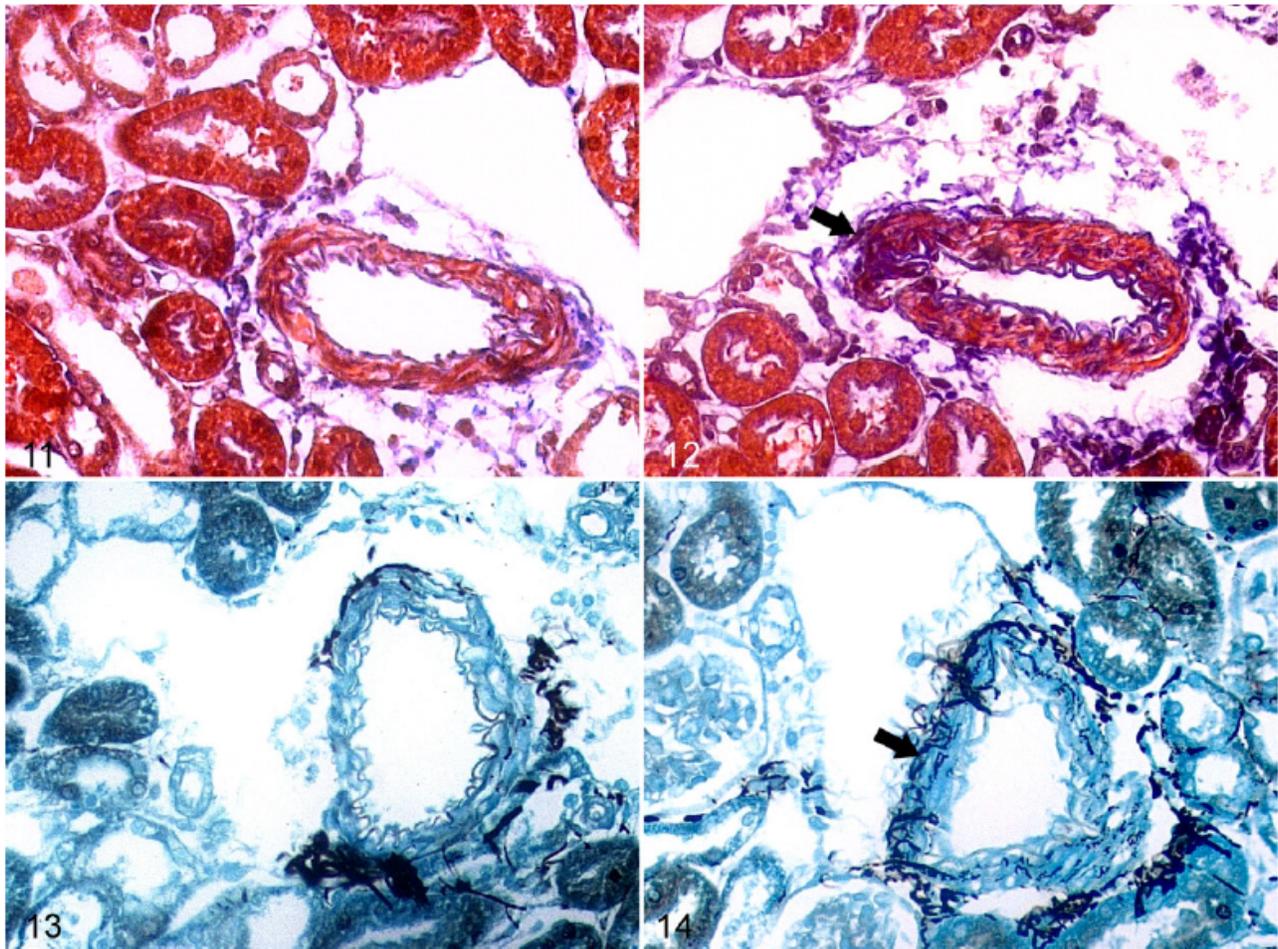


Figure 10. Based on morphometric evaluation, there is an increased glomerular area in spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to that in Wistar Kyoto rats (WKY). Means and individual data points. $N = 6$, $*P < .05$.

Immunohistochemistry Studies

Immunohistological staining using antibodies against renin, COX-2, and PRR was performed on the renal cortex. Briefly, after the kidney sections were mounted on poly L-lysine-coated glass slides, they were deparaffinized in xylene and rehydrated. Antigen unmasking was performed by microwaving the tissue sections in 0.1 M citrate buffer at pH 6 (BioGenex). After cooling, the tissue sections were washed in PBS and then incubated with the following primary antibodies: rabbit monoclonal anti-COX-2⁵¹ (1:100 in PBS dilution; CRM 306 A) or goat polyclonal anti-renin⁵⁵ (1:100 in PBS dilution; sc-27318 [E-17]; Biocare Medical and Santa Cruz Biotechnology, respectively). A negative control was performed by adding PBS instead of the primary antibody. After washing, the sections were incubated with anti-goat (1:100 in PBS dilution) or anti-rabbit (1:100 in PBS dilution) immunoglobulin conjugated to fluorescein isothiocyanate (Jackson Immunoresearch) for



Figures 11–14. Kidney, Wistar Kyoto rats (WKY; Figs. 11, 13) and spontaneously hypertensive rats (SHR; Figs. 12, 14). **Figure 11.** WKY. Normal structure of a renal cortical artery. Masson's trichrome. **Figure 12.** SHR. An artery has hypertrophy of the tunica media and presence of collagen fibers (arrow). Masson's trichrome. **Figure 13.** WKY. **Figure 14.** SHR. Reticular fiber stain (RF). The artery has reticular fibers in the tunica media (arrow). RF.

2 hours in the dark at room temperature. The sections were covered with mounting medium for fluorescence microscopy (Vectashield Mounting Medium). Immunolabeling of the PRR protein was performed by immunohistochemistry with horse-radish peroxidase-diaminobenzidine detection. The sections were rehydrated, and antigenic retrieval was performed as previously described. Sections were incubated with primary anti-PRR antibody (1:200 in PBS dilution; Ab40790, Abcam) or PBS for control and detection was performed with Histostain-SP Kits Invitrogen LAB-SA Detection System; Ref. 95-9943 (Invitrogen Corporation) according to the supplier's instructions. After the sections were washed 3 times with PBS, they were incubated with diaminobenzidine Substrate Kit, Peroxidase, Ref. SK-4100 (Vector Laboratories) for 1 minutes. Cell nuclei were stained with hematoxylin. The number of renal tubules sections and zones of juxtaglomerular cells positive for COX-2 and renin were quantified in 50 fields of renal cortex per animal. The microphotographs were captured at

40 \times magnification for PRR and 63 \times magnification for renin and COX-2.

Western Blot Analysis

This analysis was performed to quantitatively evaluate the expression of COX-2 and renin. Renal cortex tissue samples (25 mg) were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer (1 mL) containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, and a protease inhibitor cocktail (Complete Mini Roche) and centrifuged at 9520g for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was collected, and the protein was quantified using the Lowry protein assay (Thermo Fisher). Samples of the supernatants containing 100 μ g of proteins were heated for 5 minutes in Laemmli buffer, separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis with a 10% gel in a Bio-Rad Mini Protean

tetra vertical, and then electroblotted onto Immobilon-FL polyvinylidene difluoride membrane for western blotting (Sigma) using a mini trans-blot (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked with Tris-buffered saline (TBS) buffer containing 6% non-fat dry milk. For immunodetection, the blots were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies diluted in TBS: mouse monoclonal anti-renin 1:1500 (sc-137252 (A-1); Santa Cruz Biotechnology, Inc), mouse monoclonal anti-COX-2, 1:1500 (sc-376861 (H-3); Santa Cruz Biotechnology, Inc), and β -actin rabbit mAb 1:5000 (D6A8; Cell Signaling Technology). Then, the blots were incubated for 1 hour at 4 °C with fluorescently labeled secondary antibodies (LI-COR Biosciences) diluted 1:5000 in TBS. Immunoblots were digitalized with an Odyssey CLx Imaging System (LI-COR Biosciences), and densitometric analysis of the bands was performed using ImageJ software (NIH). Quantification of the bands was performed by measuring the mean optical density of a square area. The results of the optical density measurements for the 7 samples were expressed as the mean \pm standard error.

Statistical Analysis

All parameters determined in this study are presented as mean \pm standard error of the mean. The means for all assays were compared using Student's *t* test, and *P* values $<.05$ were considered statistically significant. The analysis was performed using Sigmaplot 12.5 software. The data analyzed in this study are available upon request from the corresponding author.

Results

Determination of the Systolic Arterial Pressure and Plasma Ang II, Ang (1–7), Plasma Urea, and Creatinine Levels

As expected, both strains exhibited normal blood pressure levels without significant differences between WKY (107.8 ± 3.8 mm Hg) and SHR groups (111.8 ± 3.4 mm Hg; Fig. 1). In contrast, the heart rate was significantly higher in prehypertensive SHRs (458.0 ± 8.0 beats/min; $P < .05$) than in WKYs (416.0 ± 6.1 beats/min). To evaluate RAS activity, we determined the plasma Ang II and Ang (1–7) levels in SHRs and WKYs. Plasma Ang II levels were significantly higher in prehypertensive SHRs than in WKYs (Fig. 2), whereas the plasma Ang (1–7) levels were significantly lower in SHRs (Fig. 3). To evaluate renal function, we determined the plasma urea and creatinine levels in both groups. The prehypertensive SHRs exhibited similar values of plasma urea (12.4 ± 1.07 mg/dL) compared to age-matched WKYs (13.6 ± 1.46 mg/dL), and similar values for plasma creatinine were observed in SHRs (0.232 ± 0.029 mg/dL) and WKYs (0.308 ± 0.55 mg/dL).

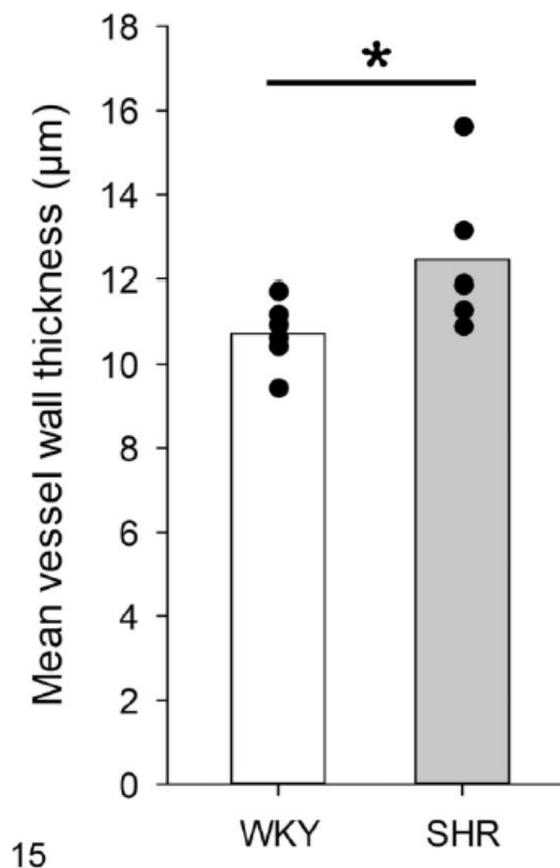
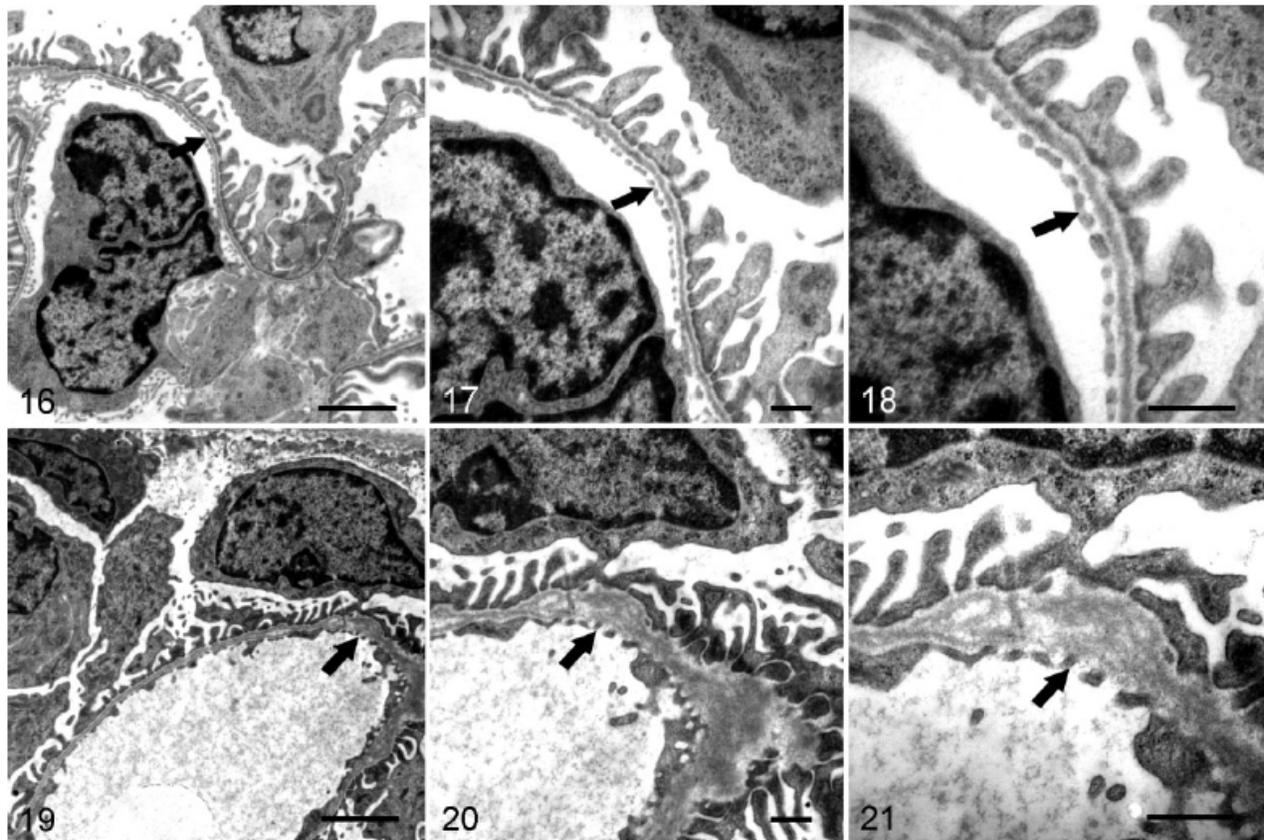


Figure 15. Based on morphometric evaluation, there is increased thickness of vessel walls in spontaneously hypertensive rats (SHR) versus Wistar Kyoto rats (WKY). Means and individual data points. *N* = 6, **P* $<.05$.

Renal Histopathology

Histologically, in comparison to WKYs (Fig. 4), there was an increase in the glomerular size in the kidney cortex of SHRs (Fig. 5). In contrast to WKYs (Fig. 6), in SHRs there was diffuse sclerosis in glomerular capillaries, including greater accumulation of PAS-positive extracellular matrix (Fig. 7). In addition, SHRs had renal tubular hypertrophy, higher intratubular protein levels, increased mesangial cell proliferation, and GBM thickening compared to WKYs (Figs. 6, 7). In comparison to WKYs (Fig. 8), SHRs had greater glomerular collagen deposition (based on Masson trichrome stain; Fig. 9). Furthermore, the glomerular area was significantly increased in SHR compared to WKY (Fig. 10).

No morphological modifications were observed in arteries in WKYs (Fig. 11), while in SHRs luminal narrowing was present along with hypertrophy of the tunica media (Fig. 12).



Figures 16–21. Kidney, Wistar Kyoto rats (WKY; Figs. 16, 17, 18) and spontaneously hypertensive rats (SHR; Figs. 19, 20, 21). Transmission electron microscopy. **Figures 16–18.** WKY. Normal morphology of glomerular capillary loops and the glomerular filtration barrier (arrows). **Figures 19–21.** SHR. Irregular thickening of the glomerular basal membrane with a multilaminar arrangement, minimal podocyte foot process effacement (fusion), and decreased endothelial fenestrations (arrows). Figures 16 and 19: bar = 2 μ m. Figures 17, 18, 20, 21: bar = 500 nm.

In addition, arteries of SHRs had elastin remodeling and new deposition in the wall (Fig. 12). The vascular alterations were not present in WKYs (Fig. 13), whereas SHRs had an increase in collagen III that was indicated by the presence of reticular fibers in the walls of arteries (Fig. 14). Thus, the vessel wall thickness was significantly increased in SHR compared to WKY (Fig. 15).

Electron Microscopy

In WKYs, the 3-layer structure of the glomerular filtration membrane was normal, with normal morphology of podocytes, clear fenestra in endothelial cells, and absence of GBM thickening (Figs. 16–18). However, the GBM of the SHR group was thickened (Figs. 19–21) and there were regions with multilamination, minimal podocyte foot process effacement (fusion), and decreased endothelial fenestrations (Fig. 21). The thickness of the GBM was 115.4 ± 2.7 nm in WKYs and 160.4 ± 6.1 nm ($P < .05$) in SHRs (Fig. 22).

Immunolocalization of PRR, Renin, and COX-2

By immunohistochemistry, PRR was immunolocalized in the apical membrane of renal tubular epithelial cells of WKYs (Fig. 23) and SHRs (Fig. 24). This receptor was also detected in the glomerulus of both strains; however, it was more abundant in the SHR group than in the WKY group (Figs. 23, 24). PRR labeling was not present in the negative controls (Figs. 25, 26).

COX-2 protein was primarily detected in the macula densa cells in WKYs (Fig. 27a, b, c) and SHRs (Fig. 28a, b, c). COX-2 was more frequently detected in SHRs than in WKYs (0.948 ± 0.063 compared to 0.750 ± 0.008 tubule sections per microscopic field, respectively; $P < .05$).

Renin protein was detected only in the juxtaglomerular cells of both strains (Figs. 29, 30). The number of glomeruli with renin-positive juxtaglomerular cells was similar in SHRs and age-matched WKYs (0.73 ± 0.08 vs 0.87 ± 0.05 glomeruli with renin-positive juxtaglomerular cells per field).

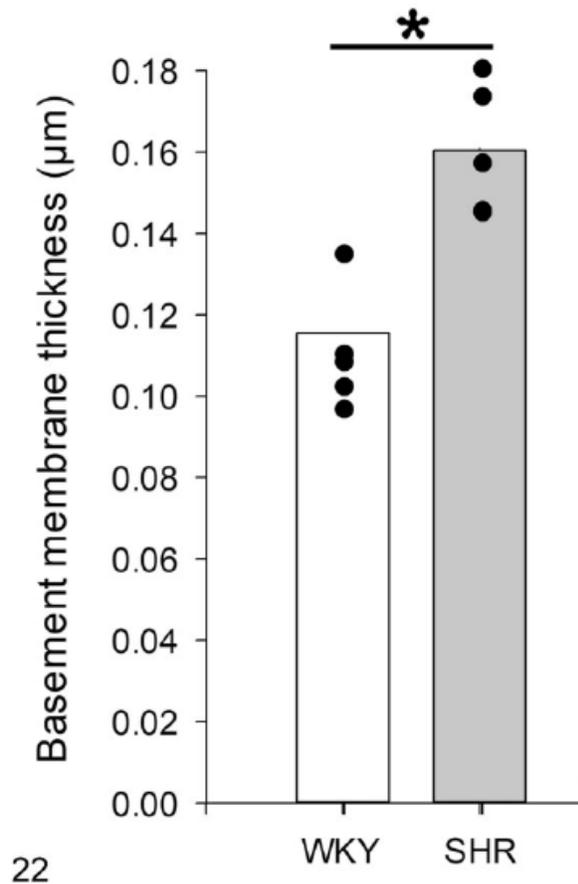


Figure 22. Based on morphometric evaluation, the glomerular basement membrane is thicker in spontaneously hypertensive rats (SHR) versus Wistar Kyoto rats (WKY). Means and individual data points. $N = 6$, $*P < .05$.

Cortical Expression of Renin and COX-2

The expression profile of COX-2 and renin in the renal cortex was evaluated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (Figs. 31–34). Two bands were detected in both strains, one corresponding to COX-2 (MW \approx 72 kDa) and another band (MW \approx 140 kDa) suggesting a dimer of COX-2 (Fig. 31a). Regarding renin, 2 bands were detected in the renal cortex of SHRs: immature renin (MW \approx 54 kDa) and renin (MW \approx 37 kDa); while only the 37 kDa band was observed in WKYs (Fig. 31b). By densitometric analysis, COX-2 protein expression was slightly elevated in SHRs compared to that in WKYs (Fig. 32). The amount of renin was significantly decreased in SHRs (Fig. 33), while the cortical expression of immature renin was markedly increased in SHRs compared with that in WKYs (Fig. 34).

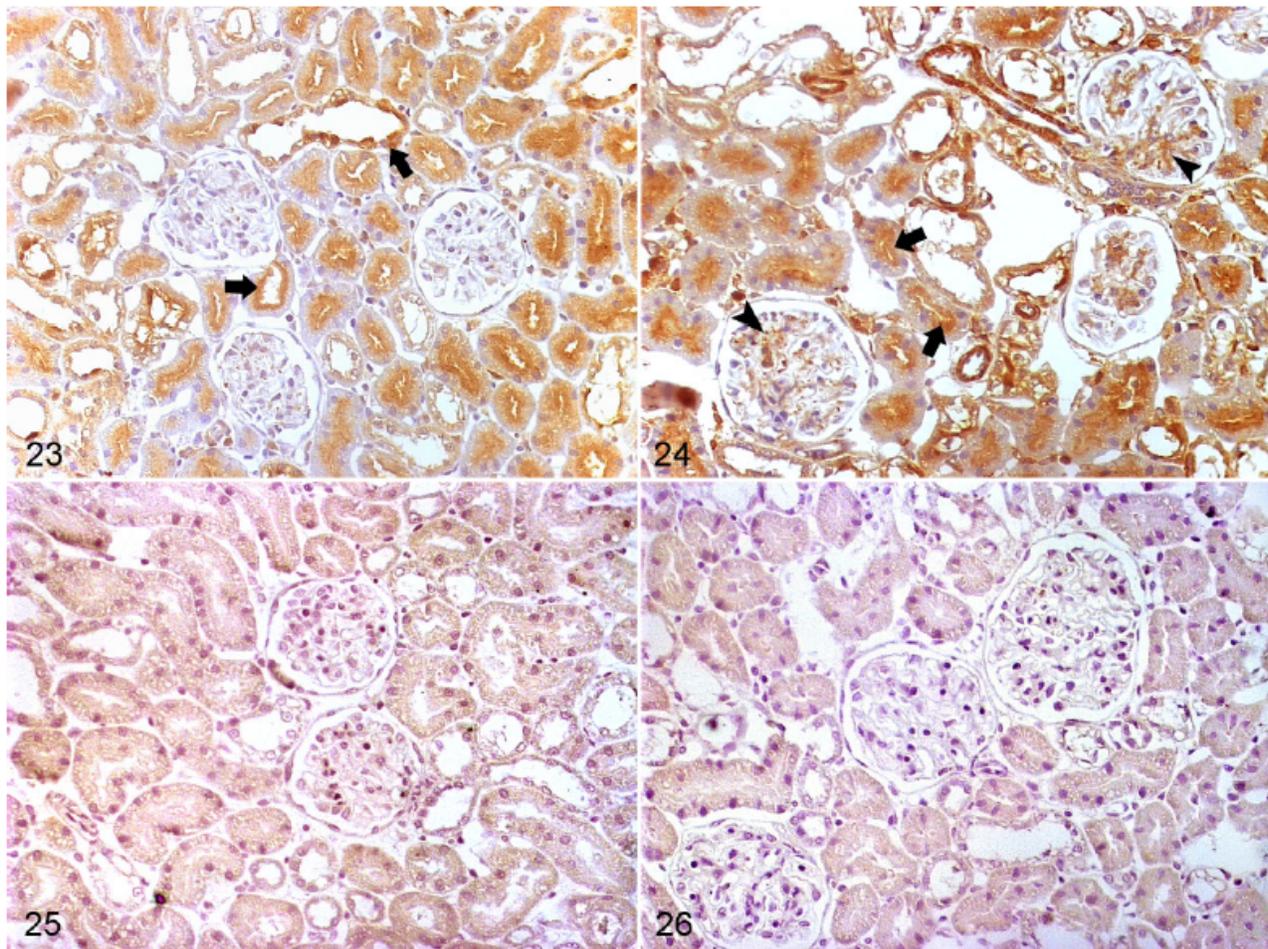
Discussion

In this study, 6-week-old SHRs showed glomerular morphological changes, including an increase in the glomerular area, an increase in extracellular matrix accumulation, mesangial and tubular epithelial cell hyperplasia, GBM thickening, and vascular hypertrophy. Additionally, there was greater immunolabeling and expression of COX-2 in the renal cortex of SHRs. There were no changes in immunolabeling of renin; however, the expression of immature renin markedly increased, while the amount of renin decreased in the renal cortex of SHRs. PRR was detected in tubular structures (mainly in epithelial cells) in both WKYs and SHRs, but PRR immunolabeling seemed to increase in the glomeruli in SHRs. These changes were associated with higher plasma Ang II levels. Thus, our study provides relevant information on renal morphological changes and the expression patterns of PRR, COX-2, and renin in the renal cortex prior to the increase in blood pressure in SHRs.

Our data showed an increase in the area of the glomerulus in prehypertensive SHRs compared to that in WKYs, suggesting the presence of glomerular hypertrophy in young SHRs. One possible cause of this alteration is mesangial cell hyperplasia, as observed in this study. *In vitro*, mesangial cells from SHRs showed a significantly higher growth rate than those from WKYs.³⁸ In response to different stimuli, mesangial cells acquire an activated phenotype and exhibit hypertrophy, proliferation, and excessive production of matrix proteins, growth factors, and cytokines.¹ Thus, in the 6-week-old SHRs, glomerular mesangial cells may respond to autocrine or paracrine stimuli that induce their activation and an early inflammatory state that contributes to glomerular hypertrophy.

In addition to the histological changes mentioned above, the GBM thickening exhibited diverse regions with a multilaminar appearance. Although this phenomenon was not observed in most glomerular capillaries of 6-week-old SHRs, mutations in collagen IV chain genes, which is a feature of Alport syndrome, must be ruled out.³⁷

SHRs are prehypertensive for the first 6 weeks of life with systolic blood pressure of approximately 100 to 120 mm Hg,^{2,12,50} and blood pressure in these rats reaches values between 180 and 200 mm Hg in adults.⁴⁸ Although other authors have reported an increase in blood pressure in SHRs before 6 weeks of age with systolic blood pressures >140 mm Hg,^{15,35,57} we used 6-week-old SHRs because this represents the time point before the development of hypertension in our colony of SHRs.⁷ Since no significant difference in blood pressure was detected, the morphological changes observed in the kidney of young SHRs are independent of hypertension and seemed to be related to neuroendocrine mechanisms. In this study, we demonstrated an increase in COX-2 protein expression in the renal cortex of prehypertensive SHRs. Others showed that COX-2 overexpression is involved in progressive renal injury in a model of nephropathy induced by renal ablation in rats, since the chronic inhibition of COX-2 attenuates the damage, reducing glomerular hypertension, and renal inflammation.¹⁴ Similarly, treatment with celecoxib, a

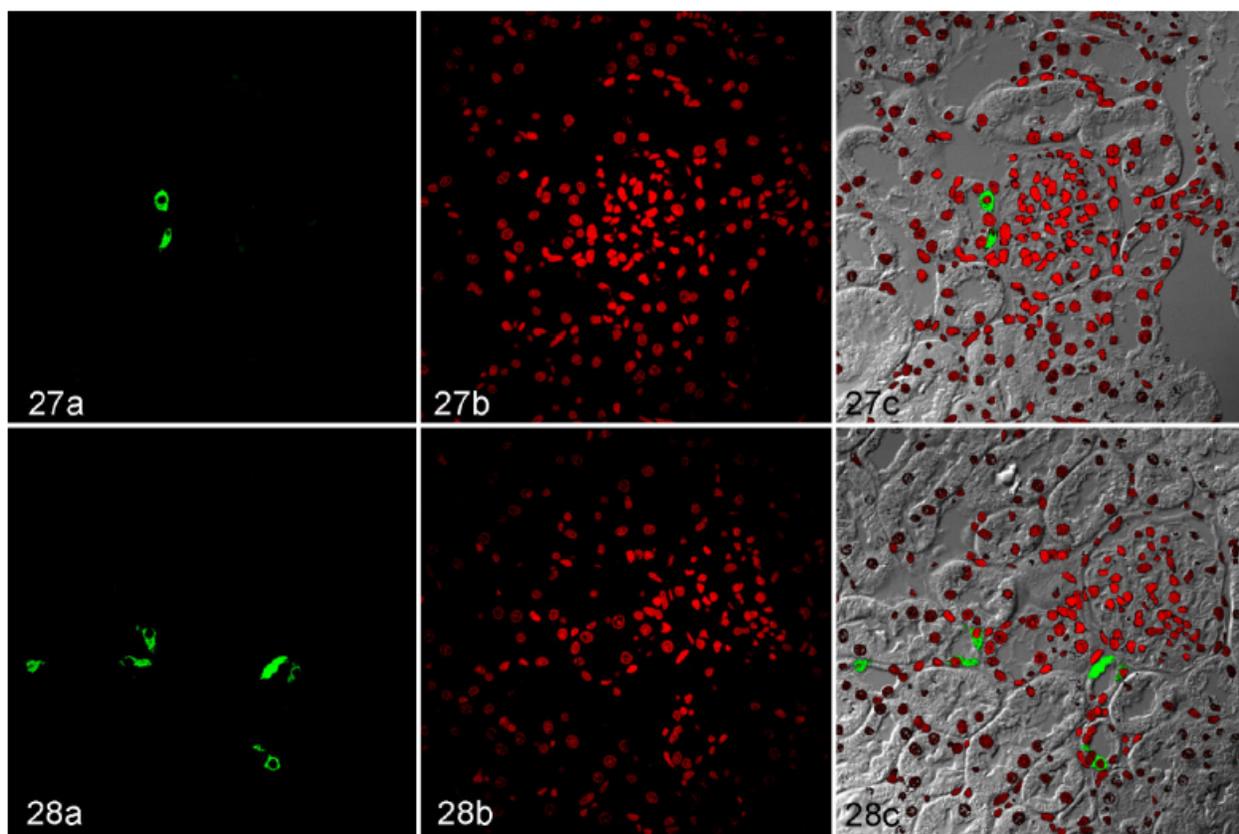


Figures 23–26. Kidney, Wistar Kyoto rats (WKY; Figs. 23, 25) and spontaneously hypertensive rats (SHR; Figs. 24, 26). Immunohistochemistry for (pro)renin receptor (PRR). **Figure 23.** WKY. PRR is found mainly in tubular epithelial cells (arrows). **Figure 24.** SHR. In addition to tubules (arrows), PRR immunolabeling is abundant in the glomerulus (arrowheads). **Figures 25–26.** Negative controls, with omission of the primary antibody, have a lack of immunolabeling.

selective COX-2 inhibitor, prevented the increase in the cellular area in proximal tubules and renal protein/DNA ratio in diabetic rats,⁵⁹ indicating that COX-2 is involved in the development of renal hypertrophy in diabetes. Additionally, it was reported that COX-2 promotes mesangial cell proliferation in culture under stress conditions.³⁶ Thus, our results suggest that COX-2-derived prostanoids could be associated with morphological alterations in the kidney of prehypertensive SHRs. However, the relationship between increased COX-2 expression and glomerular hypertrophy has not yet been proven.

In this study, COX-2-positive tubular cells were not identified. In rats, COX-2 is present in the macula densa region and a subset of thick ascending limb (TAL) epithelial cells located in the cortex and outer medulla.^{22,60} Regarding the functional significance of COX-2 in TAL cells, this isoform participates in tubular reabsorption of Na⁺ and renin release.^{19,22,47} Moreover, COX-2 also participates in the

regulation of tubuloglomerular feedback and the modulation of afferent arteriolar responses to increase in pressure.^{28,29} It is possible that COX-2 expression in the renal cortex, as observed in this study, may contribute to RAS overactivation via an increase in renin production in prehypertensive SHRs. In support of this, we found a greater amount of immature renin in the SHR renal cortex, and although our results showed that the amount of renin in the renal cortex of SHRs is decreased, this contradictory result can be explained by a greater basal renin release in 6-week-old SHRs than in WKYs.²⁴ Consistent with the above-mentioned data, our results showed a higher concentration of plasma Ang II in prehypertensive SHRs compared with that in WKYs. Taken together, this information suggests that a feedback mechanism operates between COX-2 and renin in prehypertensive SHRs, as has been demonstrated in other hypertension models.²⁰ However, we cannot rule out the participation of other



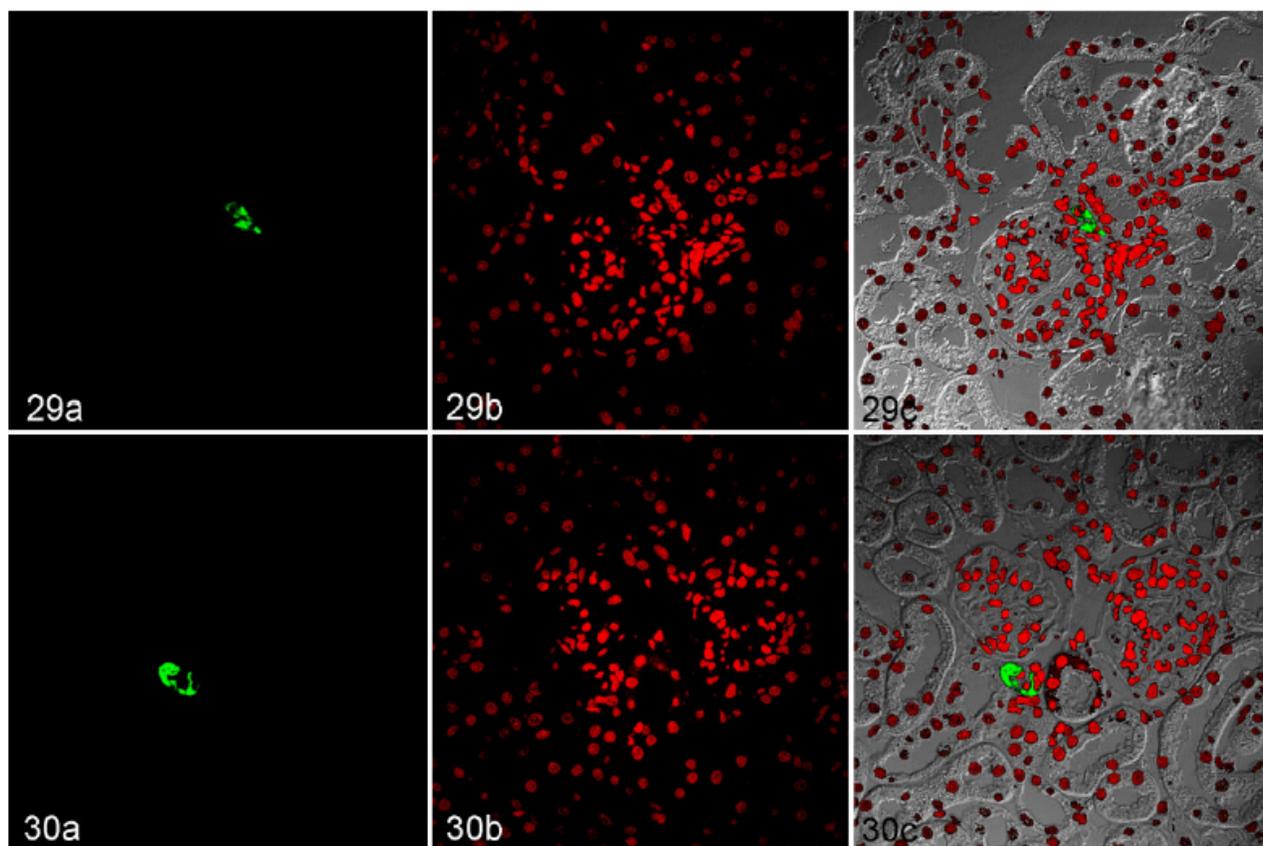
Figures 27–28. Kidney, Wistar Kyoto rats (WKY; Fig. 27a, b, c) and spontaneously hypertensive rats (SHR; Fig. 28a, b, c). Immunofluorescence for cyclooxygenase-2 (COX-2). (a) Immunolabeling of COX-2; fluorescein isothiocyanate, green signal. (b) Nuclei; propidium iodide, red. (c) Combined, viewed with phase-contrast microscopy. **Figure 27.** WKY. COX-2 labeling is principally in the macula densa. **Figure 28.** SHR. COX-2 labeling is also in the renal tubules.

systems in the activation of RAS in prehypertensive SHRs, since it has been reported that sympathetic nervous system activity is increased in prehypertensive SHRs.^{8,12,34} It is well known that the sympathetic nervous system increases renin release through β_1 -adrenoceptor stimulation in juxtaglomerular cells. In this study, prehypertensive SHRs showed a higher cardiac rate (a marker of sympathetic nervous system activity) than WKYs.⁵⁴ Thus, the sympathetic nervous system may also be involved in RAS stimulation in prehypertensive SHRs. Additionally, the sympathetic nervous system and RAS overactivation may be related to arteriolar hypertrophy and increases in vascular collagen levels, since the infusion of Ang II promotes aortic hypertrophy through AT_1 receptors and α_{1D} -adrenoceptors in rats.¹⁶

We observed an increase in PAS-positive extracellular matrix in the glomeruli of SHRs compared to that in WKYs and an increase in collagen as detected by Masson trichrome stain. These data indicate that an increase in the extracellular matrix may contribute to renal morphological alterations in prehypertensive SHRs. Thickening of the GBM and increase in extracellular matrix production have been linked to

glomerular hypertrophy.^{40,43} The COX-2 pathway and RAS are among the pathways involved in the stimulation of extracellular matrix production. Renal interstitial fibrosis decreased after the inhibition of COX-2 in a model of renovascular hypertension.⁴⁹ Moreover, evidence suggests that RAS components, such as Ang II, Ang III, and aldosterone, are critical promoters of fibrogenesis, which act by activating the signaling of growth factors such as transforming growth factor- β , which regulates extracellular matrix production.^{39,42,61} Other studies have shown that the overactivity of RAS and COX-2 is related to podocyte damage.^{4,27,44} In the glomerulus, the cell type involved in modifying GBM is the podocyte, which synthesizes and assembles matrix components and produces matrix metalloproteinases in both physiological and pathological states.⁵³ Thus, these enzymatic pathways may contribute to the alterations observed in GBM and renal fibrosis.

Other components of RAS may also be involved in renal structural changes in prehypertensive rats; for instance, Ang (1–7) has renoprotective physiological activity and counteracts the deleterious effects of Ang II in pathological conditions, such as diabetes and hypertension.^{45,46} The decrease in plasma



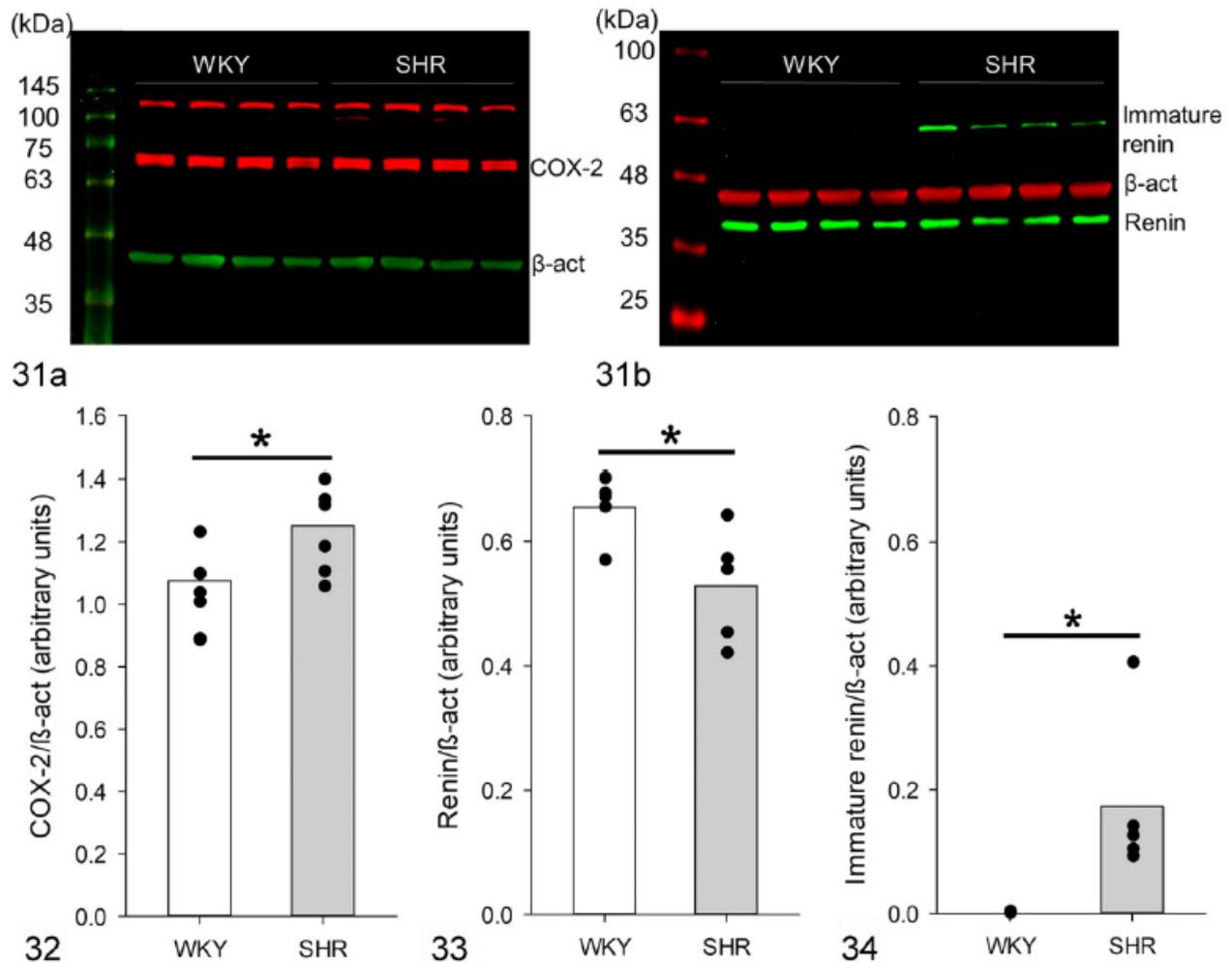
Figures 29–30. Kidney, Wistar Kyoto rats (WKY; Fig. 29a, b, c) and spontaneously hypertensive rats (SHR; Fig. 30a, b, c). Immunofluorescence for renin. (a) Immunolabeling of renin; fluorescein isothiocyanate, green signal. (b) Nuclei; propidium iodide, red. (c) Combined, viewed with phase-contrast microscopy. **Figure 29.** WKY. **Figure 30.** SHR. In both rat strains, renin protein is expressed in juxtaglomerular cells.

Ang (1–7) levels observed in this study could contribute to renal alterations in prehypertensive SHRs. Recently, it has been shown that (pro)renin activates PRR. In the kidney, PRR has been localized to the mesangium, podocytes, the macula densa, proximal tubule, distal convoluted tubule, and, in the greatest amounts, the luminal membrane of intercalated cells.^{3,26} In this study, PRR protein was detected in the apical membrane of different tubules in the renal cortex of WKYs and SHRs but we did not characterize if they were the proximal, distal, or collecting tubules. PRR was also localized in glomeruli in both strains, but it was more abundant in the SHR than in WKY glomeruli. PRR activates the mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in several cell types, including mesangial cells and collecting duct cells.^{3,26} The activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 increases cell proliferation and stimulates the production of transforming growth factor- β and upregulation of profibrotic factors, such as plasminogen-activator inhibitor-1, fibronectin, and collagen.³³ PRR activation is also related to vascular

damage in the kidney.⁵² Moreover, PRR has been reported to directly or indirectly contribute to the regulation of renal cortical COX-2 expression.^{18,31} The increase in immature renin observed in the renal cortex could also be involved in renal alterations through PRR activation in prehypertensive SHRs.

To evaluate whether the morphological changes observed in this study were related to functional alterations in the kidney, plasma urea and creatinine levels were measured. We did not find changes in these parameters in prehypertensive SHRs, indicating that renal function was not yet altered or a compensatory adaptation of the residual kidney mass masked the loss of function.¹¹ Our results are consistent with previous studies that demonstrated that the urinary excretion of biomarkers of early kidney damage, such as albumin, osteopontin, and Kim-1 were not modified in 6- and 8-week-old SHRs.^{17,23,30}

Finally, our results raise the need for further studies of other components of RAS and COXs and the use of pharmacological treatments with enzyme inhibitors to understand the role of these enzymatic pathways in early renal morphological



Figures 31–34. Western blot analysis of renin and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in renal cortex. **Figure 31 a.** Immunoblot: COX-2 in red; beta actin in green. **Figure 31 b.** Immunoblot: renin and immature renin in green; beta actin in red. **Figure 32.** COX-2 protein is more abundant in the renal cortex of spontaneously hypertensive rats (SHR) versus Wistar Kyoto rats (WKY). **Figure 33.** Renin is less abundant in SHR. **Figure 34.** Immature renin is more abundant in SHR compared to WKY. The graphs represent the means and the individual data points. $N = 4-6$, $*P < .05$.

changes, such as glomerulosclerosis and glomerular or vascular hypertrophy and in the development of hypertension in SHRs. Thus, SHR is an attractive model for studying early renal and vascular damage and neurohormonal disorders that could influence in the pathophysiology of primary arterial hypertension.

Acknowledgements

The authors are grateful for the excellent technical assistance provided by Damaris Ilhuicatzli Alvarado. This manuscript is a requirement for Camren G. Mondragón-Huerta to obtain her PhD in Biología Experimental in Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Grant No. 102022); the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Grant No. IN221615); the

Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA), Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-Iztacala, UNAM) (Grant FESI-DIP-PAPCA 2014-37); and CGMH was supported by a doctoral fellowship from CONACyT (Grant No. 202693) and the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

ORCID iD

Maximiliano Ibarra-Barajas  <https://orcid.org/0000-0003-2874-8291>

References

- Abboud HE. Mesangial cell biology. *Exp Cell Res*. 2012;**318**(9):979–985.
- Adams MA, Bobik A, Korner PI. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension*. 1989;**14**(2):191–202.
- Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, et al. The (pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension*. 2009;**54**(2):261–269.
- Agrawal S, Guess AJ, Chanley MA, et al. Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2. *Kidney Int*. 2014;**86**(6):1150–1160.
- Baumann M, van Essen H, Hermans JJ, et al. Functional and structural post-glomerular alterations in the kidney of prehypertensive spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2004;**26**(7–8):663–672.
- Casare FA, Thieme K, Costa-Pessoa JM, et al. Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;**310**(11):F1295–F1307.
- Castro-Moreno P, Pardo JP, Hernandez-Munoz R, et al. Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2012;**32**(3 pt 4):61–69.
- Cates MJ, Steed PW, Abdala AP, et al. Elevated vertebral artery resistance in neonatal spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2011;**111**(1):149–156.
- Cheng HF, Wang JL, Vinson GP, et al. Young SHR express increased type 1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol*. 1998;**274**(1):F10–F17.
- Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med*. 2011;**17**(11):1402–1409.
- Cowgill LD, Polzin DJ, Elliott J, et al. Is progressive chronic kidney disease a slow acute kidney injury? *Vet Clin Am Small Anim Pract*. 2016;**46**(6):995–1013.
- Dang A, Zheng D, Wang B, et al. The role of the renin-angiotensin and cardiac sympathetic nervous systems in the development of hypertension and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 1999;**22**(3):217–221.
- Forty EJ, Ashton N. The urotensin system is up-regulated in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *PLoS One*. 2013;**8**(12):e83317.
- Fujihara CK, Malheiros DM, Donato JL, et al. Nitroflurbiprofen, a new non-steroidal anti-inflammatory, ameliorates structural injury in the remnant kidney. *Am J Physiol*. 1998;**274**(3):F573–F579.
- Fukuda S, Tsuchikura S, Iida H. Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/lzm, SHRSP/lzm and WKY/lzm. *Exp Anim*. 2004;**53**(1):67–72.
- Gallardo-Ortiz IA, Rodriguez-Hernandez SN, Lopez-Guerrero JJ, et al. Role of α 1D-adrenoceptors in vascular wall hypertrophy during angiotensin II-induced hypertension. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2015;**35**(3):17–31.
- Gan Z, Huang D, Jiang J, et al. Captopril alleviates hypertension-induced renal damage, inflammation, and NF- κ B activation. *Braz J Med Biol Res*. 2018;**51**(11):e7338.
- Gonzalez AA, Luffman C, Bourgeois CR, et al. Angiotensin II-independent upregulation of cyclooxygenase-2 by activation of the (pro)renin receptor in rat renal inner medullary cells. *Hypertension*. 2013;**61**(2):443–449.
- Green T, Gonzalez AA, Mitchell KD, et al. The complex interplay between cyclooxygenase-2 and angiotensin II in regulating kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;**21**(1):7–14.
- Guzman-Hernandez EA, Villalobos-Molina R, Sanchez-Mendoza MA, et al. Early co-expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney cortex contributes to the development of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;**93**(4):299–308.
- Hao CM, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol*. 2008;**70**:357–377.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, et al. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*. 1994;**94**(6):2504–2510.
- Heijnen BF, Van Essen H, Schalkwijk CG, et al. Renal inflammatory markers during the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2014;**37**(2):100–109.
- Henrich WL, Levi M. Ontogeny of renal renin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Am J Physiol*. 1991;**260**(4 pt 2):F530–F535.
- Hinojos CA, Doris PA. Altered subcellular distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in proximal tubules in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004;**44**(1):95–100.
- Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int*. 2006;**69**(1):105–113.
- Huby AC, Rastaldi MP, Caron K, et al. Restoration of podocyte structure and improvement of chronic renal disease in transgenic mice overexpressing renin. *PLoS One*. 2009;**4**(8):e6721.
- Ichihara A, Imig JD, Inscho EW, et al. Cyclooxygenase-2 participates in tubular flow-dependent afferent arteriolar tone: interaction with neuronal NOS. *Am J Physiol*. 1998;**275**(4):F605–F612.
- Ichihara A, Imig JD, Navar LG. Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension*. 1999;**34**(4 pt 2):843–847.
- Inoue BH, Arruda-Junior DF, Campos LCG, et al. Progression of microalbuminuria in SHR is associated with lower expression of critical components of the apical endocytic machinery in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;**305**(2):F216–F226.
- Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int*. 2006;**70**(4):641–646.
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, et al. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007;**59**(3):251–287.
- Krop M, Lu X, Danser AH, et al. The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned? *Pflugers Arch*. 2013;**465**(1):87–97.
- Larsen HE, Bardsley EN, Lefkimiatis K, et al. Dysregulation of neuronal Ca²⁺ channel linked to heightened sympathetic phenotype in prohypertensive states. *J Neurosci*. 2016;**36**(33):8562–8573.
- Lee SK, Arunkumar S, Sirajudeen KNS, et al. Glutathione system in young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Biochem*. 2010;**66**(4):321–327.
- Li S, Cheng S, Sun Z, et al. Indoxyl sulfate induces mesangial cell proliferation via the induction of COX-2. *Mediators Inflamm*. 2016;**2016**:5802973.
- Lin X, Suh JH, Go G, et al. Feasibility of repairing glomerular basement membrane defects in Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2014;**25**(4):687–692.
- Lopes de Faria JB, Zoukhri D, Lorenzi M. Mesangial cell abnormalities in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. *Kidney Int*. 1997;**52**(2):387–392.
- Maccioni D, Remuzzi G, Benigni A. Key fibrogenic mediators: old players. Renin-angiotensin system. *Kidney Int Suppl (2011)*. 2014;**4**(1):58–64.
- MacKay K, Striker LJ, Stauffer JW, et al. Relationship of glomerular hypertrophy and sclerosis: studies in SV40 transgenic mice. *Kidney Int*. 1990;**37**(2):741–748.
- Mazzei L, Garcia M, Calvo JP, et al. Changes in renal WT-1 expression preceding hypertension development. *BMC Nephrol*. 2016;**17**:34.

42. Memuni S, Rubattu S, Pierelli G, et al. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens*. 2014;**28**(2):74–79.
43. Miner JH. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol*. 2011;**26**(9):1413–1417.
44. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JG, et al. Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am J Pathol*. 2011;**179**(4):1719–1732.
45. Padda RS, Shi Y, Lo CS, et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide to treat hypertension and nephropathy in diabetes? *J Diabetes Metab*. 2015;**6**(10):10.4172/2155-6156.1000615.
46. Patel VB, Zhong JC, Grant MB, et al. Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 axis of the renin-angiotensin system in heart failure. *Circ Res*. 2016;**118**(8):1313–1326.
47. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol*. 2010;**21**(7):1093–1096.
48. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998;**39**(1):77–88.
49. Richter CM, Godes M, Wagner C, et al. Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats. *J Hypertens*. 2004;**22**(1):191–198.
50. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, et al. Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;**315**(1):51–57.
51. Romualdo GR, Prata GB, da Silva TC, et al. Fibrosis-associated hepatocarcinogenesis revisited: establishing standard medium-term chemically-induced male and female models. *PLoS One*. 2018;**13**(9):e0203879.
52. Rusai K, Jianxing C, Schneider R, et al. Renin inhibition mitigates anti-angiogenesis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2011;**29**(2):266–272.
53. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;**69**(12):2131–2147.
54. Shanks J, Manou-Stathopoulou S, Lu CJ, et al. Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;**305**(7):H980–H986.
55. Stodola TJ, de Resende MM, Sarkis AB, et al. Characterization of the genomic structure and function of regions influencing renin and angiogenesis in the SS rat. *Physiol Genomics*. 2011;**43**(13):808–817.
56. Tenorio-Lopez FA, Zarco-Olvera G, Sanchez-Mendoza A, et al. Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta*. 2010;**80**(5):1702–1712.
57. Tikellis C, Cooper ME, Bialkowski K, et al. Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension? *Kidney Int*. 2006;**70**(1):34–41.
58. Ueyehara CF, Gellai M. Impairment of renal function precedes establishment of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1993;**265**(4 pt 2):R943–R950.
59. Vázquez-Cruz B, Rangel-Veladiz J, Segura-Cobos D, et al. Effect of cyclooxygenase-2 blockade on renal hypertrophy development during early diabetes mellitus. *Pharmacol Pharm*. 2013;**4**(3):288–295.
60. Vio CP, An SJ, Cespedes C, et al. Induction of cyclooxygenase-2 in thick ascending limb cells by adrenalectomy. *J Am Soc Nephrol*. 2001;**12**(4):649–658.
61. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int*. 2006;**70**(11):1914–1919.