



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRIA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGIA



**“ANALISIS DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR A PRO –
RENINA EN EL CORAZON DE RATA DURANTE EL
EMBARAZO NORMAL Y CON PRECLAMPSIA”**

MCyP EMILIO MOCTEZUMA LÓPEZ CALDERÓN

DIRECTORES DE TESIS

DRA. LILIANA ANGUIANO ROBLEDO

DR. ÁNGEL MILIAR GARCÍA

ÍNDICE

1. Lista de abreviaturas
2. Índice de figuras
3. Índice de graficas
4. Agradecimientos.
5. Resumen.
6. Abstrac
7. INTRODUCCIÓN.
 - A. Sistema Cardio-circulatorio
 - B. Modificaciones cardíacas durante el embarazo
 - C. Regulación de la función cardíaca por el SRA-A
 - D. Cambios cardiovasculares durante el embarazo
 - E. Sistema renina angiotensina aldosterona.
 - a) SRA sistémico.
 - b) SRA local.
 - c) RPR
 - I. Síntesis de renina
 - II. Vías de señalización
 - F. El SRA en el control cardiovascular.
 - G. El SRA y su participación en el desarrollo de la hipertensión arterial.
 - H. PRECLAMPSIA.
 - a) Participación del SRA en la preeclampsia

8. JUSTIFICACIÓN.
9. HIPÓTESIS.
10. OBJETIVO GENERAL.
 - a. objetivos particulares.
11. MATERIAL Y MÉTODOS.
 - a. GRUPOS DE ESTUDIO.
 - b. METODOLOGÍA.
 - i. Medición de presión arterial.
 - ii. Determinación de proteinuria.
 - iii. Inmunoblot.
 - iv. RT – PCR tiempo real.
 - v. Soluciones.
12. RESULTADOS.
13. DISCUSIÓN.
14. CONCLUSIONES.
15. BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE ABREVIATURAS

SRA Sistema Renina Angiotensina

ON₂ Oxido Nítrico

NOS Oxido Nítrico Sintetasa

R – AT₁receptor a angiotensina tipo I

R – AT₂receptor a angiotensina tipo II

Ang I Angiotensina I

Ang II Angiotensina II

HAS Hipertensión Arterial Sistémica

DM II Diabetes Mellitus II

SHAM Operación simulada

CASR Coartación Aortica SubRenal.

RPR Receptor a Pro Renina

ADH Hormona antidiuretica

aa Aminoácidos

Ser Serina

Thr Treonina

Tyr Tirosina

MAPK Cinasas Activadas por Mitogenos

JNK cinasas de jun N – terminal

PLZF proteína promielocitica en forma de dedos de zinc

ECA Enzimas Convertidora de Angiotensina

TAM Tensión Arterial Media

ET Endotelina

ÍNDICE DE FIGURAS

PAGINA	FIGURA
17	Figura 1. Esquema del sistema renina angiotensina
21	Figura 2. Mecanismos de activación de la pro renina
23	Figura 3. Estructura esquemática del RPR
27	Figura 4: Vías de señalización intracelular
29	Figura 5: participación del receptor en las complicaciones de la hipertensión, corte histológico de corazón.
30	Figura 6: Intercomunicación entre el RPR y receptores AT2
41	Figura 7. interacción de las diferentes teorías de la pre eclampsia asociadas a la isquemia feto placentaria

ÍNDICE DE GRAFICAS

Paginas	Grafica
58	Grafica 1. Medición de la Presión Arterial Sistólica (PAS) en mmHg en la cola de la rata por el método pletismográfico.
59	Gráfica 2. Excreción de proteínas en orina de 24 hr.
60	Grafica 3 y 4. Cuantificación de ingesta de agua y uresis de 24hrs en los grupos control.
61	Grafica 5 y 6. Medición de talla y peso de las crías de los grupos Embarazada SHAM y ratas Preclampticas.
62	Grafica 7. Expresion proteica del RPR en los segmentos, auricula izqueirda, auricula derecha, septum , y pared ventricular izquierda.
63	Grafica 8. Expresión génica del RPR en los diferentes segmentos de corazón estudiados, aurícula izquierda, aurícula derecha, septum, y pared ventricular izquierda.
64	Graficas 9 y 10. Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento de auricula izquierda.
65	Graficas 11 y 12 . Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento de auricula derecha.
66	Graficas 13 y 14 . Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento del septum.
67	Graficas 15 y 16 . Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento pared ventricular izquieda.

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por permitirme estar en este mundo y darme las herramientas necesarias para superarme, por la fuerza y valor que me dio a través de su palabra.

A mi madre. Por enseñarme a no ser conformista, buscar siempre lo mejor y morir en el intento para lograr mis sueños, gracias mamá por ti logre lo que ser lo que soy.

A mi padre. Por enseñarme que no debo de estresarme en los momentos difíciles, a disfrutar cada momento y vivir como si fuera el ultimo día.

A la Dra. Liliana. Por enseñarme las maravillas de la investigación, la pasión por el conocimiento, y el reto que tenemos enfrente, pero más aun, por la amistad y confianza que pusiste en mi, gracias lili.

Al Dr. Pedro, gracias porque a pesar de que nunca fue su obligación fue un tutor, maestro, y amigo.

A Rafa. Por las fuerzas que me diste sin siquiera saberlo, por los ánimos y tu forma muy particular de llamarme la atención cuando fallo, por no dejarme solo, sin ti no hubiera sido esto posible, mil gracias Rafa.

RESUMEN

Se puede definir al embarazo como un estado fisiológico temporal de la mujer, que con diversos cambios fisiológicos, tanto cardiovasculares como renales, entre otros ([Inaba S et. al. 2008](#)). Dentro de los cambios cardiovasculares encontramos una disminución en la respuesta vascular, esta disminución puede ser debido a diferentes factores como el aumento de agentes vaso dilatadores (NO_2 , prostaciclina, entre otros) ([Conrad et. al. 1999](#); [McLaughlin et. al. 1995](#)) así como una disminución y/o poca reactividad vascular a agentes presores tales como la Ang II ([Halligan et. al. 1993](#); [Novak et. al. 1997](#); [William et. al. 1997](#)). Estudios realizados en el laboratorio han demostrado un aumento en la participación de componentes del SRA como los R - AT_1 y R - AT_2 ([Anguiano et. al. 2007](#)). Por tanto el SRA participa en forma importante en el control de la regulación de la presión sanguínea durante el embarazo y cuando este equilibrio se rompe da lugar a trastornos como la pre eclampsia. La preeclampsia se define como una alteración propia del embarazo que se caracteriza por elevación de la presión arterial, proteinuria y edema, en mujeres antes normotensas después de la semana 20 de la gestación ([ACOG, 2002](#); [OMS 2005](#)).

Conforme ha avanzado la investigación en el SRA se han encontrado nuevos componentes de este sistema, destacando la participación del receptor a renina/pro-renina, al cual se le han atribuido diversas funciones, como diferenciación neuronal en el periodo fetal y funciones cognitivas ([Contrepas A, et. al. 2008](#)), participación en las complicaciones cardíacas secundarias a HAS

(Ichihara et. al. 2006), complicaciones renales en HAS y DM II (Krebs, et. al. 2007; Ichihara, et. al. 2006), entre otras.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar y analizar la expresión del RPR en tejido cardiaco de rata embarazada y embarazada con pre eclampsia. Para ello se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar que fueron divididos en 3 grupos: no embarazadas SHAM (grupo control), ratas embarazadas SHAM, y ratas embarazadas con CASR como modelo de pre eclampsia. Todos los animales fueron sacrificados al término del embarazo, obteniendo el corazón el cual fue dividido en segmentos (aurícula izquierda, aurícula derecha, septum y pared ventricular izquierda) para determinar su expresión proteica y génica mediante estudios de Western Blot y RT – PCR en tiempo real.

Los resultados demostraron la existencia del RPR en los diferentes segmentos del corazón fuera de la condición de embarazo, los resultados muestran también que el embarazo provoca una tendencia a elevar la expresión proteica del RPR en todos los segmentos del corazón, esta tendencia concuerda con la tendencia a elevar la expresión génica del RPR, los resultados mostraron que la condición de pre eclampsia provoca un aumento significativo en la expresión proteica del RPR y que la expresión génica presenta la misma tendencia hacia la elevación.

Los resultados sugieren que el RPR juega un papel importante en la regulación de la PA fuera de la condición de embarazo, en el embarazo, y en el embarazo complicado con pre eclampsia, pudiendo participar en la fisiopatología

de la pre eclampsia sin que el RPR capaz de generar cambios morfológicos en el tejido cardiaco como se ha encontrado en otros estudios con mayor tiempo de exposición a la HAS ([Ichiara et. al. 2006](#)).

ABSTRAC

Pregnancy can be defined as a physiological state temporary of the woman, with various changes in physiological, both cardiovascular and kidney, among others (Inaba S et to the. 2008). Cardiovascular changes are a decrease in vascular response, this decrease may be due to different factors as agents vessel dilators (ON2, prostacyclins, among others) (Conrad et. Al. 1999;) McLaughlin et. to the. (1995) as well as a decrease or little vascular reactivity to agents such as Ang II pressors (Halligan et. Al. 1993;) Novak et. to the. 1997; William et. to the. (1997). The laboratory studies have shown an increase in the participation of the SRA as R - AT1 and R - AT2 components (Anguiano et to the. 2007). Therefore the SRA participates in an important in the control of the regulation of blood pressure during pregnancy and when this balance is broken leads to disorders like the pre eclampsia. Pre-eclampsia is defined as a disorder of pregnancy that is characterized by elevation of blood pressure, proteinuria and edema in women before normotensas after the 20th week of gestation (ACOG, 2002;) (WHO 2005). As we have advanced research in the SRA found new components of this system, emphasizing the participation of the recipient to Renin/pro-Renin, which have been attributed to various functions such as neuronal differentiation in fetal period and cognitive functions (Contrepas A., et al. 2008), participation in cardiac complications secondary to have (Ichihara et. Al. 2006), renal complications in have and DM II (Krebs, et. to the. 2007;) Ichihara, et. to the. (2006), among others. Therefore the aim of this work was to determine and analyze the expression of the RPR in tissue heart of rat pregnant and pregnant with pre eclampsia. Were so

used rats Wistar strain females were divided into 3 groups: pregnant women not SHAM (control group), SHAM, pregnant rats and rats pregnant CASR modelled pre eclampsia. All animals were sacrificed at the end of pregnancy, getting the heart which was divided into segments (left, right atrium, septum and left ventricular wall) to determine its protein and gene expression studies of Western Blot and RT - PCR in real time. Results showed the existence of the RPR in different segments of the heart out of the condition of pregnancy, the results also show that pregnancy causes a tendency to raise the protein expression of the RPR in all segments of the heart, this trend is consistent with the trend to increase gene expression of the RPR, the results showed that pre eclampsia condition causes a significant increase in the protein expression of the RPR and gene expression has the same trend towards rising. The results suggest that the RPR plays an important role in regulating the PA outside of the condition of pregnancy, pregnancy, and pregnancy complicated with pre eclampsia, and can participate in the pathophysiology of the pre eclampsia without the RPR to generate morphological changes in cardiac tissue as it found in other studies with greater exposure time to the HAS (Ichihara et. Al. 2006).

INTRODUCCIÓN

SISTEMA CARDIO-CIRCULATORIO

El corazón es un órgano muscular hueco, en los humanos se sitúa en el mediastino de la cavidad torácica, por encima del diafragma orientado ligeramente a la izquierda, histológicamente está formado por dos tipos de células, musculares y fibroblasto ([Dostal and Baker, 1992](#)). La principal función del sistema cardiovascular es el transporte de sustancias, ya sean hormonales, nutrientes, oxígeno, o de desecho. El corazón como tal es una bomba fisiológica compuesta de 4 cavidades que funcionan en conjunto, su función principal es impulsar la sangre hacia la circulación sistémica y pulmonar. Para esto, el corazón se contrae de forma sincronizada en cada uno de sus segmentos, logrando que la sangre circule a través y fuera del mismo. La regulación mecánica de este ciclo está limitado por cuatro factores que se interrelacionan entre sí; 1) la precarga, que es la carga sanguínea pasiva producto del retorno venoso que determina la longitud de las fibras musculares previo a la contracción, 2) la poscarga, es la suma de todas las fuerzas que la fibra miocárdica debe de vencer (volumen telediastolico, impedancia aortica, resistencia arterial, volumen sanguíneo en la aorta, resistencia vascular periférica, entre otras) para expulsar la sangre del ventrículo izquierdo durante la sístole, 3) la contractilidad o inotropismo, referido a la fuerza con la cual se contrae el musculo cardiaco, y 4) frecuencia cardiaca, o cronotropismo, que se refiere al número de contracciones por minuto del corazón como conjunto ([Shiels. et. al. 2008](#); [Stöhr EJ et. al 2010](#)). Estos parámetros pueden ser modificados según las demandas sistémicas. Los mecanismos de estimulación del corazón son

2 en general: 1) una regulación cardíaca intrínseca dada por variaciones de volumen en la precarga (ley de Franck - Starling); y 2) control de la frecuencia cardíaca y fuerza de bombeo por el sistema nervioso autónomo (Guyton – Hall 2001). En general, el sistema nervioso autónomo funciona a través del sistema simpático excitando el corazón, provocando que se acelere hasta 5 o 6 veces su frecuencia cardíaca basal, mientras que el sistema parasimpático puede disminuir la frecuencia cardíaca hasta 30 o 40 latidos por minuto (Guyton – Hall 2001).

Independientemente de los mecanismos de regulación antes mencionados, hay otros mecanismos de regulación cardíaca de importancia fisiológica, como son el SRA (Kim et., al. 2001), la trasposición de líquidos entre capilares e intersticio, la secreción de hormonas como la aldosterona, ADH, péptido atrial natriurético. En conjunto, estos mecanismos pueden regular la actividad cardíaca a corto, mediano, y largo plazo, que se pueden traducir en una modificación de la presión arterial sistémica (Guyton – Hall 2001).

MODIFICACIONES CARDIACAS DURANTE EL EMBARAZO

Las modificaciones inducidas en el sistema cardiocirculatorio durante el embarazo normal tienen como finalidad resolver las demandas metabólicas crecientes de la madre y el feto. En condiciones normales durante el embarazo, existe un aumento de la volemia que es máximo hacia las 32 semanas de gestación. La volemia o gasto cardíaco (volumen sistólico por la frecuencia cardíaca) se incrementa en un 40 a 50% es decir de 4,88 L/min a 7,34 L/min y lo

hace gracias al incremento de plasma (40-60%) y una disminución de la concentración de la hemoglobina (10-11 g/dl) como de hematocrito dando como resultado una anemia dilucional (hemo dilución). La hipervolemia inducida por el embarazo permite satisfacer por lo tanto, las necesidades metabólicas, y la perfusión sanguínea de la unidad feto-placentaria así como proteger a la madre de la pérdida hemática durante el parto. La mayor parte del incremento del gasto cardiaco se dirige a la circulación útero placentaria y riñones. A su vez, existe una disminución de las resistencias vasculares paralelo al incremento de la volemia, debido a la vasodilatación sistémica y a la placentación, que supone la creación de una enorme fístula arteriovenosa de baja resistencia ([Wittaker, 1996](#); [Villaverde, 2003](#)).

Sin embargo, en contraposición a este incremento del gasto cardiaco, se produce un descenso de la presión sanguínea por disminución de las resistencias vasculares sistémicas, siendo su valor más bajo a mitad del embarazo aumentando progresivamente hasta final del mismo sin llegar a valores basales. Esta caída de la presión arterial se ha asociado a un aumento en la resistencia a la angiotensina II probablemente como consecuencia de la refractaridad vascular a Ang II.

REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIACA POR EL SRA- A

Uno de los sistemas más importantes, y menos estudiados del control cardiaco es el mediado por el SRA, este control es ejercido a través de los

receptores AT_1 , estimulados por la ANG II, esta estimulación provoca hipertrofia del ventrículo izquierdo (Dostal et. al. 1992), así como un incremento moderado en la presión arterial, necrosis de miocitos y miocitolisis, si la infusión con ANG II continua provocaran proliferación de fibroblastos, y remodelación cardiaca (Tan et. al., 1992). Otros estudios han reportado que la infusión constante de ANG II (200 ng/kg/min) provocan un incremento en la expresión de mRNA para es esqueleto de α – actina, β –BHC, ANF, fibronectina, TGF – β y colágeno I y III, esto provoca un posterior aumento en la masa del ventrículo izquierdo (Kim et. al., 1995). Algunos estudios en cultivos celulares de miocitos y fibroblastos cardiacos han demostrado el incremento de moléculas de señalización intracelular posteriores al estímulo con ANG II, entre los que destacan las MAPS cinasas incluyendo ERK y JNK, que pueden ser los responsables de la hipertrofia de miocitos y la reprogramación genética o proliferación de los fibroblastos (Force et al. 1996; Sugden and Clerk, 1998; Wang et al., 1998).

SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA (SRA)

En el pasado el concepto tradicional atribuido al sistema renina angiotensina aldosterona (SRA) endocrino o circulante implicado en la regulación de la presión arterial (PA) y el equilibrio hidrosalino ha cambiado y cobrado gran importancia (Tamargo et. al., 1996; Paul et. al., 2006; Dzau et. al., 2005; Watanabe et. al., 2005). Cuando la PA disminuye como resultado de la restricción de sodio o de hipovolemia, las células yuxtglomerulares del riñón sintetizan una enzima, la

renina, que se libera a la sangre circulante. La renina rompe el enlace existente entre Leu 10 y Val 11 del angiotensinógeno que es sintetizada en el hígado produciendo un decapeptido inactivo, la angiotensina I (Ang I); ésta sufre la acción de la enzima de conversión de angiotensina (ECA), que hidroliza el dipéptido terminal His9-Leu10 de la Ang I y la convierte en Ang II. La Ang II produce una respuesta vasoconstrictora arteriovenosa (que incrementa las resistencias vasculares periféricas y la PA) ([Senbonmatsu, et. al. 2010](#)) cambios en la función glomerular, tubular renal y un aumento en la liberación de aldosterona, efectos que producen una retención renal de sodio y agua, con lo que aumenta aún más la PA. Estas acciones permiten restaurar la volemia y la PA. A su vez, la Ang II estimula los receptores AT₁ en las células yuxtglomerulares y produce una inhibición de la síntesis y la liberación de renina a este nivel, con lo que se regula la activación del SRA.

Por el contrario, la activación crónica del SRA, tanto circulante como local produce que la síntesis de Ang II que actúa sobre receptores AT₁ en las células diana, incrementa las resistencias vasculares (sistémicas, pulmonares y coronarias), estimule la liberación de mediadores vasoconstrictores, produzca disfunción endotelial y efectos proliferativos (hipertrofia e hiperplasia celular, fibrosis) que estarán implicados en el remodelamiento cardiovascular y respuestas proinflamatorias y protrombóticas ([Tamargo et. al., 1996](#); [Paul et. al., 2006](#); [Dzau et. al., 2005](#); [Watanabe et. al., 2005](#)). Todas estas acciones conducen a un aumento permanente de la PA y la aparición de alteraciones en la estructura y función cardiovascular (hipertrofia cardíaca) como renal.

Recientemente se ha demostrado que pro renina y renina ligados endógenos con actividad enzimática son moléculas activas que interactúan con un receptor específico PRR y que su estimulación activa diversas vías de señalización independientes de las activadas por la angiotensina II (Robson 2008).

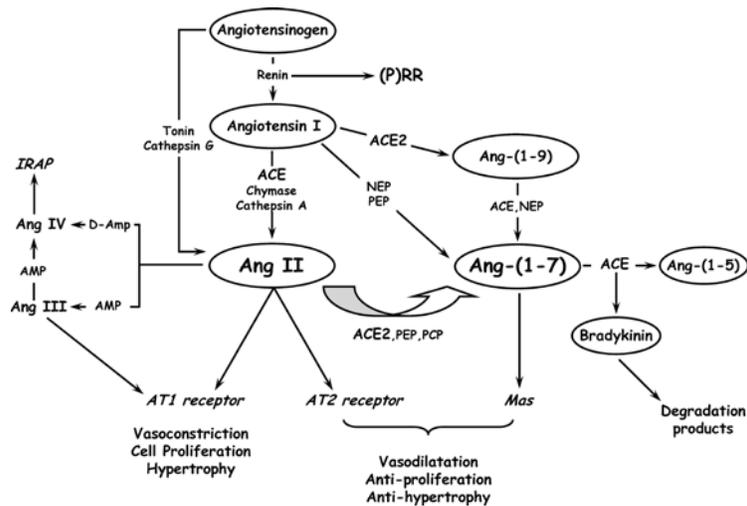


Figura 1. Esquema del sistema renina angiotensina Robson 2008, en donde se destacan algunos de los nuevos componentes del sistema

COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

RENINA

La molécula de la renina consta de dos lóbulos homólogos, separados por una hendidura, en la que se localiza el centro activo de la enzima, que contiene dos residuos de ácido aspártico (Asp 32 y Asp215) localizados en cada uno de los lóbulos (Danser & Deinum 2005; Sielecki et. al., 1989). El centro catalítico de la

renina acoge siete de los aminoácidos del angiotensinógeno y rompe el enlace peptídico Leu¹⁰-Val¹¹ de éste para forma Ang I. El centro catalítico de la renina presenta varios bolsillos característico de la familia de las aspartil proteasas ([Rahuel et. al. 2000](#)).

La renina es una aspartil proteasa de 340 aa (35-45 KDa) que se sintetiza como una pro enzima, en las células mioepiteliales del aparato yuxtaglomerular renal, y en otros tejidos (retina, testículo, ovario, placenta, glándulas salivales, mastocitos, y cerebro) pueden sintetizar pro renina ([Danser & Deinum 2005](#)). La pro renina y la renina se sintetizan y almacenan en las células yuxtaglomerulares del riñón, desde donde son liberadas a la circulación sistémica en respuesta a:

1. vía del baroreceptor intrarenal,

La estimulación de los barorreceptores de la arteriola glomerular aferente en respuesta a una reducción de la presión de perfusión renal secundaria a hipovolemia.

2. La estimulación de los receptores adrenérgicos β_1

El sistema nervioso simpático, media la liberación de noradrenalina de la terminal simpática postganglionar, activando el receptor β_1 de las células yuxtaglomerulares provocando la secreción de renina ([Goodman & Gilman, 2005](#)).

3. Vía de la macula densa

La macula densa se encuentra adyacente a las células yuxtaglomerulares y está formada por células especializadas situada entre las arteriolas aferentes y eferentes, la estimulación de los quimiorreceptores de la mácula densa por

reducción de la carga de sodio y cloro produce la excreción de renina (mediado por prostaglandinas) o su inhibición (mediado por adenosina).

La conversión de la pro renina en renina implica la pérdida de 43 aa, se realiza exclusivamente en las células yuxtglomerulares del riñón y se sigue de la liberación de la renina a la sangre circulante (Nguyen et. al 2002). Sin embargo, la concentración circulante de pro renina es unas 10 veces más con respecto a la de renina (1pmol/l). También ha sido descrito que las concentraciones de pro renina en los líquidos folicular ovárico y amniótico así como el líquido intersticial en tejidos de corazón, riñón, cerebro pueden ser unas 100 veces superiores a las concentraciones plasmáticas (Hsueh & Baxter, 1991), al parecer únicamente el 1% de pro renina se unirá al RPR (10pM) (Nguyen, 2008), sin que se haya reportado una función para estas concentraciones tan altas en el intersticio.

Igualmente, los valores de prorrenina aumentan en la placenta de mujeres con preeclampsia, lo que indica un papel de la prorrenina/renina en la génesis de este padecimiento (Singh et. al., 2004). Adicionalmente, en corazones humanos con cardiomiopatía dilatada, la concentración cardiaca de pro renina es superior a la observada en el corazón de donantes (Danser et. al., 1997). Por el contrario, la estimulación crónica del SRA aumenta la conversión de pro renina en renina, con lo que disminuye el cociente pro renina/renina.

PRO RENINA

Durante años se consideró que la pro renina era el precursor inactivo de la renina y que su función estaría relacionada con la formación de Ang II.

La pro renina es un péptido de 383 aminoácidos el cual tiene un dominio inhibidor de 43 aminoácidos en la región N-terminal que es el responsable de cubrir la parte activa e impedir el acceso del angiotensinogeno (Nguyen, 2008). La pro – renina es sintetizada como una pre – hormona por el riñón (Susuki, F. 2007), se ha encontrado que la pro renina no solo se sintetiza en las células yuxtglomerulares sino también, en los túbulos colectores, glándulas adrenales, ojo, células de Müller, mastocitos, miometrio, testículo, ovario, y placenta (Nguyen, 2008); desde estos tejidos es secretada constantemente a circulación general por lo que la relación es mucho mayor con respecto a la renina (9:1) en plasma (Poisner AM. 1995), así mismo también hay reportes de que en el intersticio de los tejidos donde es sintetizada la pro renina es aproximadamente 1 molécula de renina por cada 100 de pro renina (Nguyen, 2007). La pro – renina posee un receptor propio, receptor a pro – renina (RPR) (Poisner AM. 1995). Dada las concentraciones plasmáticas de pro renina en comparación con la renina, se ha sugerido que esta tiene una mayor actividad metabólica que la renina, sobretodo en situaciones patológicas como falla cardiaca, hipertensión arterial, glomeruloesclerosis, aterosclerosis, entre otras (Felt S, 2008).

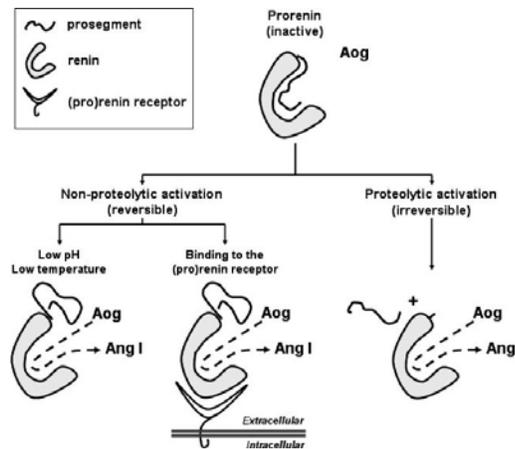


Figura 2. Mecanismos de activación de la pro renina, vía proteolítica, y vía no proteolítica activada por la participación del RPR (Danser et. al. 2007)

RECEPTOR RENINA / PRO RENINA

A partir de 1996 se describieron diversas proteínas de unión a la renina, en diferentes tejidos, tanto de humano, rata y de cerdo; dentro de estas proteínas destaca la *N*-acil-D-glucosamina 2-epimerasa (Maru, I. et. Al. 1996), pero a pesar de ser descrita y analizada posteriormente se refirió que ninguna de estas proteínas presentaba actividad fisiológica. En 1998, Ludwig y cols. Demostraron que el extremo C-terminal del RPR se asociaba a la ATPasa vacuolar transportadora de H⁺ (ATP6AP2), que causa la acidificación citoplasmática y de diversas organelas intracelulares (lisosomas, endosomas, vesículas sinápticas). El complejo RPR/ATP6AP2 se encuentra en todos los tejidos de los vertebrados, aunque alcanza su mayor concentración en el sistema nervioso central. El complejo RPR/ATP6AP2 se expresa fundamentalmente en el interior celular y en la fracción microsomal, mientras que es mínima su expresión en la superficie

celular ([Saris et. al., 2006](#)), tal como lo habían propuesto [Nguyen](#) y su grupo en el año 2002. Esto indica que la renina intracelular podría participar en la regulación de otras funciones celulares.

En el 2002, se describe por primera vez una proteína transmembranal que se une tanto a renina como a su precursor, la pro renina. Recibiendo el nombre de receptor a renina/pro renina. [Nguyen](#) en el año 2002 describió por primera vez el receptor a renina/pro – renina (RPR), o ATP6AP2 una proteína transmembranal de 350 residuos aa, que fue identificada en cultivos de células mesangiales humanas, células musculares lisas vasculares del subendotelio glomerular, arterias renales y coronarias. La expresión del RNAm de este receptor alcanza los niveles más altos en cerebro, corazón y placenta; en menor grado en hígado, riñón (células mesangiales y de los túbulos distales y colector), células musculares lisas vasculares renales, coronarias y sanguíneas (macrófagos, células T y granulocitos) y, en mínimo grado, en pulmón, músculo esquelético y retina ([Nguyen et. al. 2002](#); [Campbell et. al., 2008](#)).

Ha sido descrito que el gen *n14f* de 2,034 Kb codifica la síntesis de la proteína RPR de 39.008 KDa. El RPR tiene una vida media de 30 hrs y presenta una alta una alta afinidad ($K_i=0.4\text{nmol}$) por pro renina activa y renina del que se disocian muy lentamente (semivida de 4 h para la renina) ([Nguyen et. al. 2002](#)). El RPR presenta dos regiones hidrofóbicas un segmento transmembranal de 350 aa, con un extremo N-terminal extracelular largo (extremo-amino-terminal), no

glucosilado y muy hidrofóbico, que se encarga de la unión de la pro renina y la renina y un extremo C- terminal intracitoplasmático muy corto de unos 20 aminoácidos que constituye su sitio de anclaje a la membrana celular. De los 24 aa localizados en el citoplasma Ser 337, Thr 343, Tyr 335, y Tyr 340 son considerados como los residuos más probables donde se realiza la modulación por fosforilación, siendo la Tyr 335 el sitio más probable de fosforilación (NetPhos 2.0 prediction) (Nguyen et. al., 2002).

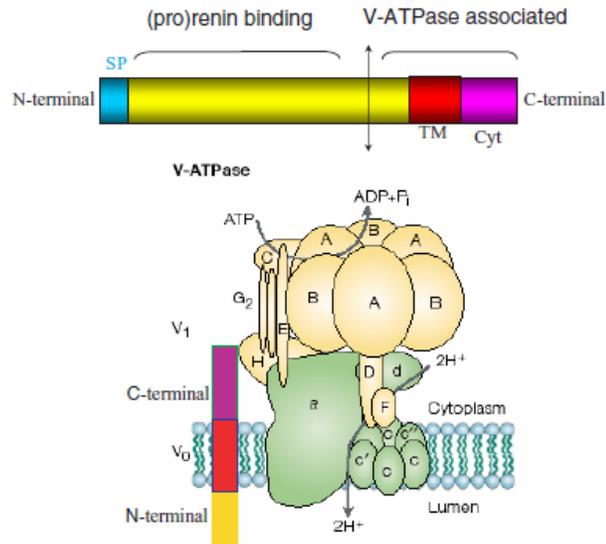


Figura 3. Estructura esquemática del RPR y su asociación con la v – ATPasa, en la parte C- terminal se observa su sitio de unión a la membrana y su unión a la v – ATPasa, y en la N - terminal se observa su sitio de unión a la renina / pro renina (Nguyen et. al. 2008)

ACTIVACIÓN DE LA PRO RENINA

En condiciones normales, la pro renina no es catalíticamente activa debido a que un prosegmento de 43 aa localizado en el extremo N-terminal obstruye la hendidura donde se encuentra la zona catalítica e impide que el angiotensinógeno acceda a ella ([Danser & Deinum 2005](#)). La actividad catalítica de la pro renina puede activarse por dos mecanismos, uno proteolítico y otro no proteolítico.

La activación proteolítica es un proceso irreversible que tiene lugar tras la escisión o pérdida del prosegmento por agentes endógenos (catepsina B en las células yuxtglomerulares del riñón, así como diversas serinas proteasas de otros tejidos) ([Sielecki et. al., 2001](#); [Neves et. al., 1996](#)) lo que deja libre la zona catalítica. La activación proteolítica sólo tiene lugar en las células yuxtglomerulares del riñón y conduce a la síntesis de renina activa, que será almacenada o liberada a la circulación sistémica.

La activación no proteolítica es un proceso reversible que implica dos pasos sucesivos, un desplazamiento del prosegmento que deja libre la zona catalítica, seguido de un cambio conformacional, que convierte la pro renina en renina activa ([Derkx et. Al., 1992](#)). La activación no proteolítica de la pro renina puede producirse también; una vez que ésta se ha unido a su receptor; esta vía sería la causa, en gran parte, de la síntesis de Ang I y Ang II en la superficie de las células diana ([Nguyen et. al., 2002](#); [Atsuhiko, 2006](#)), lo que avalaría la hipótesis de que el aumento de la concentración plasmática de pro renina se asociaría a un

aumento en la activación del SRA tisular ([Danser et. al. 2005](#); [Zhao et. al., 2006](#)). Esto indicaría que la activación tisular no proteolítica de la pro renina estaría implicada en la activación del SRA local (no del SRA circulante) y tendría una importante participación en la génesis y/o la progresión de las lesiones de los órganos diana.

Vías de señalización activadas por el PRR

La unión de pro renina y/o renina a su receptor produce dos tipos distintos de efectos. En primer lugar, aumenta la actividad catalítica de la renina 4-5 veces, acelerando la conversión del angiotensinógeno en Ang I en la superficie de la membrana de las células de los órganos diana en íntimo contacto con la ECA y los receptores AT1; como consecuencia aumenta la síntesis de Ang II y se activa el SRA ([Nguyen et. al., 2002](#); [Danser et. al., 2007](#)). Cuando la pro renina se une al PRR, sufre una activación no proteolítica y adquiere una actividad catalítica similar a la de la renina, por lo que en estas condiciones podría tener un papel fisiológico ([Nguyen et. al., 2002](#); [Nabi et. al., 2006](#)).

Por otro lado, la interacción de la pro renina y/o la renina con el PRR produce la activación de diversas vías de señalización que son independientes de la formación de Ang II ([Nguyen et. al., 2002](#); [Campbell, 2008](#); [Nguyen 2006](#); [Scheffé et. al., 2006](#)). Pro renina y renina inducen la fosforilación de residuos de serina y tirosina localizados en el extremo C-terminal intracitoplasmático (Ser337, Tyr335, Tyr340) y de las cinasas reguladas por señales extracelulares Erk1/2 (p44/p42 MAPK) implicadas en la hipertrofia y la proliferación celular ([Nguyen et. al., 2002](#);

[Saris et. al. 2002](#)). Estas acciones explicarían por qué la fibrosis y la hipertrofia observadas en ratas que sobre expresan pro renina o el RPR son independientes de la Ang II y de las cifras de PA ([Veniant et. al., 1996](#); [Burckle et. al., 2006](#)).

Pro renina y renina aumentan la concentración de TGFB₁ en las células mesangiales humanas y de ~~ratas~~ [Huang Y et. al. 2006](#)); este efecto es independiente de la Ang II, ya que no implica al receptor del factor de crecimiento epidérmico ([Huang et. al., 2006](#); [Huang et. al., 2007](#)). El TGFB₁ a su vez, activa la síntesis del inhibidor tipo-1 del activador del plasminógeno (PAI-1), que posee propiedades profibróticas y protrombóticas y de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I y la fibronectina ([Scheffe et. al., 2006](#); [Nguyen et. al., 1996](#); [Huang et. al., 2006](#); [Huang et. al., 2007](#)).

En cardiomiocitos neonatales, se ha reportado que incluso en ausencia de angiotensinógeno, la pro renina activa la p38, c-jun, y JNK perteneciente a la familia de MAPK ([Ichihara A, et. al. 2006](#)) proteínas involucradas en la estimulación del crecimiento celular ([Funke - Kaiser 2009](#)). La pro renina activa la p38 y fosforila la proteína de choque térmico (HSP) ([Yakota et. al., 2005](#); [Saris et. al., 2006](#)). Estas moléculas son parte de cascadas de señalización que están determinadas para la diferenciación, crecimiento celular, y proliferación por segundos mensajeros acoplados a proteínas G ([Sakoda et. al. 2007](#)), estas modificaciones en la expresión proteica al final de la señalización y transcripción genética, se empiezan a notar a partir del minuto 20 posterior a la estimulación de

los RPR ([Sakoda et. al. 2007](#)). Cabe resaltar que no en todos los tejidos se presenta la misma expresión de componentes de las vías de señalización, por ejemplo, en el corazón, hay una mayor expresión de ERK 1 /2, y una disminución de c -jun, mientras que en cultivos de células mesangiales se invierte esta relación, este comportamiento puede ser debido a las funciones específicas del receptor para cada órgano y/o tejido.

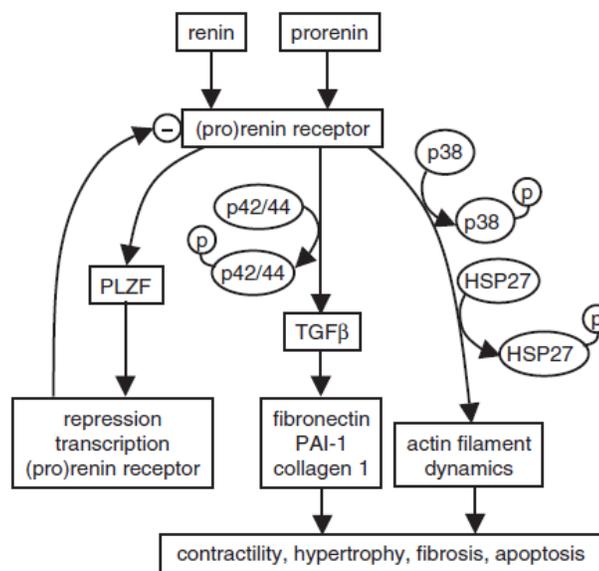


Figura 4: Vías de señalización intracelular y sus posibles respuestas celulares, reportadas por [Danser 2007](#)

OTRAS FUNCIONES DEL RPR

Datos recientes indican que el RPR podría ser importante en otras funciones celulares independientes de la activación de la prorenina y la renina. Así en ratones, peces cebra o *C. elegans*, la supresión del gen que codifica el RPR es letal ([Burckle & Bader 2006](#); [Amsterdam et. al., 2004](#)). Además, células madre

embrionarias de ratón deficientes en RPR no generan quimeras cuando se inyectan en blastocitos. Estos hallazgos indican que el RPR tendría un papel fundamental en la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular, además de que parece participar en el desarrollo del sistema nervioso central y las funciones cognitivas.

Hay que señalar que no todas las funciones del receptor son patológicas, dentro del desarrollo embrionario se ha descrito que participa activamente en la diferenciación y especialización de células mesangiales, cerebro, demostrando esta actividad en rata, ratón, y algunas especies de peces. En corazón parece estar implicado en esta etapa del desarrollo especializando a las células, esto se comprobó al generar cepas knock-out de ratones en los cuales se retiró el exón 2 del gen codificante para el RPR, y se observó que los productos de estos ratones nacían vivos, pero fallecían antes del día 20, todos por falla cardíaca, incrementando la relación peso cardíaco/peso corporal ([Kinouchi K. 2010](#)).

A pesar de las características y efectos que se han reportado a cerca del receptor no se ha podido demostrar su participación en la etiología de la hipertensión arterial sistémica, sin embargo, los datos reportados lo involucran en diferentes complicaciones de la hipertensión esencial como es el desarrollo de hipertrofia cardíaca secundaria a la hipertensión arterial mediante la activación de su vía de señalización intracelular y formación de Ang II en la superficie celular ([Ichiara et al. 2006](#)). En este sentido Ichiara además demostró que la administración de un decapeptido bloqueador del RPR (NH₂ – RILLKKMPSV – COOH) en ratas espontáneamente hipertensas revertía el desarrollo de fibrosis

cardiaca perivascular, comparado con su propio control sin tratamiento, comprobando así las características hipertróficas antes mencionadas.

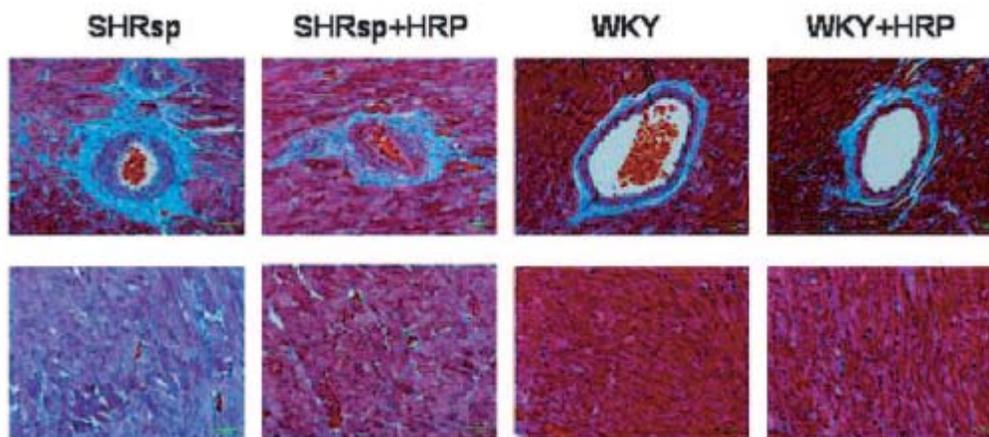


Figura 5: se muestra la participación del receptor en las complicaciones de la hipertensión, con una tinción de tricromo de masson, se observan aéreas de fibrosis (azul) marcadas en el tejido de ratas espontáneamente hipertensas de 12 semanas (SHRsp), efecto que se revierte en las ratas espontáneamente hipertensas en tratamiento con un bloqueador específico del RPR (HSRsp + HRP), acercándose a los controles sanos de ratas wistar (WKI) y ratas wistar sanas con antagonista específico (WKY+HRP) (Ichihara et al. 2006).

Schefe en el año 2006 reportó una interregulación entre el receptor AT_2 y el RPR, la estimulación del RPR por la renina induce la interacción del dominio C-terminal del receptor con el factor de transcripción promielocítico dedos de Zinc (PLZF), ya que ambos comparten esta proteína adaptadora promielocítica, esta

proteína PLZF es traslocada hacia el núcleo inhibiéndose parcialmente la transcripción del RPR (Scheffe et.al., 2006), este podría ser un mecanismo de retroalimentación negativo ya que la menor expresión del RPR prevendría una excesiva activación del SRA. Con este dato se sugiere que hay una intercomunicación entre las vías de señalización de ambos receptores, lo que permite que haya una activación de tipo crosstalk de cada una de estas vías sin necesidad de que haya activación del receptor en cuestión, lo cual podría potencializar el efecto hipertrófico y fibrotico propios de la estimulación constante de ambos receptores.

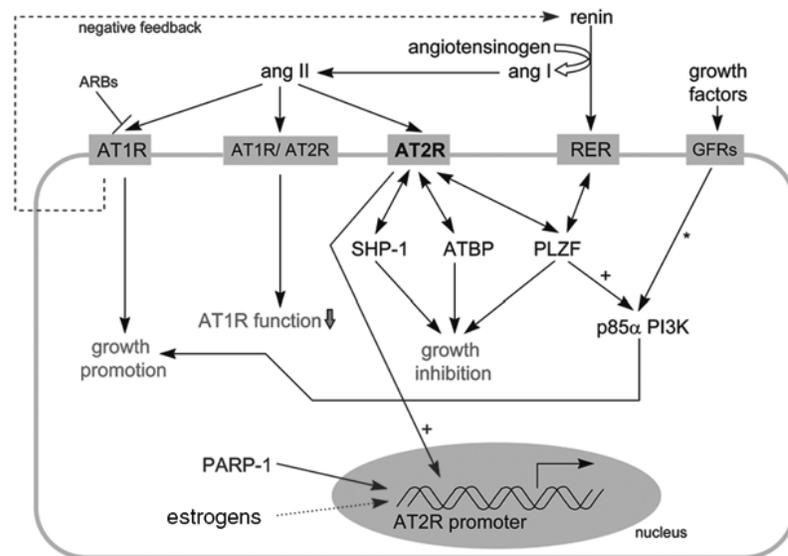


Figura 6: Intercomunicación entre el RPR y receptores AT2 reportado por Funke-Kaiser 2009.

ANGIOTENSINOGENO

El angiotensinogeno es sintetizado principalmente en el hígado como pre angiotensinogeno una proteína glomerular con un peso entre 55 y 60 KDa y 452 aminoácidos, la cual se hidroliza en su porción amino terminal dejando cadenas cortas de 14 aa sienta el angiotensinogeno propiamente. Se ha encontrado también RNAm codificante del angiotensinogeno en sistema nervioso central, riñón, tejido graso, y corazón, se libera constantemente a la circulación general, y en ciertas circunstancias fisiológicas y patológicas puede aumentar sus concentraciones en circulación general, entre las que destacan el embarazo normal, el embarazo complicado con hipertensión y la hipertensión esencial, teniendo diferentes funciones fisiológicas o patológicas en cada una de estas patologías. Una vez que el angiotensinogeno es captado por la renina sufre una escisión en el aa 11 transformándolo en un decapeptido la angiotensina I (Ang I) el cual es el sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Robson, et. al. 2008).

ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

La ECA es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, encontrándose en circulación, intersticio, superficies celulares e intracelulares, se ha descrito su localización en diversos órganos como cerebro, vasos sanguíneos, riñón, glándulas suprarrenales, corazón, entre otros (Robson et.al. 2008).

Se han descrito 3 isoformas de la ECA las cuales tienen como sustrato el angiotensinogeno, todas producen una ruptura en diferentes aa del angiotensinogeno obteniendo diferentes productos con una actividad metabólica diferente. La isoforma I, la más abundante, es una proteína de 1278 aa con dos dominios catalíticos, su función es romper el enlace peptídico de la porción carbonilo terminal de la Ang I en los dos últimos aa generando un octapeptido. La angiotensina II (Ang II) una proteína de 805 aa, es una glicoproteína transmembranal tipo I con un dominio catalítico extracelular con un peso aproximado de 120 KDa que se ha localizado predominantemente en corazón, riñones y testículos, entre otros; usa zinc como cofactor, pertenece a la familia de las peptidasas M2.

EMBARAZO

Cambios fisiológicos durante el embarazo.

El embarazo se define como un estado fisiológico que transcurre entre la implantación del ovulo fecundado en el útero hasta el momento del parto, y comprende todos los cambios fisiológicos, metabólicos y morfológicos (Schwarcs, 2002), la causa de todos estos cambios no está bien establecida, pero parece ser multifactorial el origen de estos cambios sobretodo propiciados por el ambiente hormonal del propio embarazo.

Dentro de los múltiples cambios existentes con el sistema cardiovascular, algunos de los cuales son el aumento del volumen sanguíneo, aumento del gasto cardiaco y paradójicamente una disminución en las resistencias vasculares periféricas. Se ha reportado que a partir de la segunda mitad del embarazo hay un aumento progresivo del volumen plasmático que puede llevar hasta el 50% sobre la basal, hay también una disminución del hematocrito proporcional al aumento del volumen plasmático lo que puede llegar a confundirse con una anemia dilucional; la disminución en las resistencias vasculares periféricas parece estar asociada a dos factores importantes, el aumento de agentes vaso dilatadores (NO_2 , prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado de endotelio) (Conrad et. al. 1999; McLaughlin et. al. 1995) así como una disminución y poca reactividad vascular a agentes presores tales como la Ang II (Halligan et. al. 1993; Novak et. al. 1997; William et. al. 1997). Estos cambios son más evidentes durante el tercer trimestre del embarazo y a pesar de que se han descrito estos cambios en múltiples estudios solo se ha podido describir que estos cambios son de origen multifactorial y son el resultado de estímulos y modificaciones a nivel de sistema nervioso central, hormonal, y modificaciones estructurales del propio corazón.

Estudios han demostrado un cambio en la proporción y distribución de los receptores AT_1 y AT_2 , con un aumento de los AT_2 y una disminución de los AT_1 reportados en corteza y medula renal hacia el tercer trimestre del embarazo lo que explica en parte la hipotensión característica (Anguiano et. al. 2007).

ENFERMEDADES HIPERTENSIVAS DEL EMBARAZO

Las enfermedades hipertensivas del embarazo son un conjunto de patologías que presentan a la hipertensión añadida o preexistente, en el embarazo, existen múltiples clasificaciones de este grupo de enfermedades, una de las más aceptadas es la de [Gant y Worley \(1980\)](#), que dice:

1. **Hipertensión inducida por el embarazo:** preeclampsia y eclampsia genuinas. Es un síndrome específico hipertensivo de la mujer embarazada que desaparece después del parto o tras la primera semana de puerperio. Normalmente la preeclampsia incluye además de hipertensión arterial, proteinuria y edemas. Aparece después de la 20 semana; existe un cuadro parecido precoz (antes semana 20) que puede deberse a una mola vesicular. Si la preeclampsia se agrava puede desembocar en eclampsia: cuadro clínico caracterizado por convulsiones y coma. La preeclampsia y la eclampsia esenciales son características de primigestas, sobre todo si son menores de 20 años. En las pacientes de más edad, la mayor incidencia se da en mujeres mayores de 35 años.

2. **Hipertensión crónica y embarazo.** Se incluye cualquier enfermedad hipertensiva anterior al embarazo que cumpla: demostración clínica de cifras elevadas de presión arterial antes del embarazo o descubrimiento de la hipertensión arterial (HTA) antes de la semana 20 (excluir la mola). En ocasiones, se diagnostica a posteriori por la

persistencia de la hipertensión arterial (HTA) tras el embarazo. A veces, la hipertensión arterial cursa sin grandes modificaciones durante la gravidez, pero pueden aparecer alteraciones diversas.

3. **Preeclampsia y eclampsia sobreañadidas a hipertensión**

crónica. La frecuencia en la que una hipertensión arterial crónica derive en preeclampsia oscila entre un 25-70%. El desencadenamiento de estos cuadros suele ocurrir en la segunda mitad del embarazo, pero de aparición más precoz que en los casos de preeclampsia esencial. Puede aparecer eclampsia entre la 24-30 semana. Lo que es muy raro es la eclampsia genuina. Se diagnostica por el agravamiento de una hipertensión arterial preexistente junto con edemas o proteinuria (o ambos). Pueden aparecer alteraciones retinianas agudas. Puede plantearse un problema en el diagnóstico diferencial de 1 y 3.

4. **Hipertensión tardía o transitoria.**

Aumento de la presión arterial en algunas gestantes al final del embarazo, en el parto o en el puerperio precoz. Puede tratarse de hipertensión arterial inducida por el embarazo de carácter leve o de un primer brote de hipertensión arterial esencial. Desaparece antes del final de la primera semana del puerperio y no hay edemas ni proteinuria.

PRE ECLAMPSIA

De esta clasificación nosotros únicamente nos enfocamos en el primer grupo, la preeclampsia, la cual es definida como una alteración propia del embarazo que se caracteriza por elevación de la presión arterial, proteinuria y edema, en mujeres antes normotensas después de la semana 20 de la gestación, la cual puede estar acompañada con retraso en el crecimiento intrauterino y parto prematuro. ([Davison et. al. 2004](#))

Debido al aumento en la TAM se producen daños en diferentes órganos entre los más estudiados y reportados encontramos en el riñón una Endoteliosis capilar glomerular con tumefacción de las células endoteliales mesangiales, y depósitos fibrinoide en la membrana basal; en el **endotelio** existe una disfunción por disminución de la liberación de sustancias vasopresoras, y una disminución en la liberación de sustancias vasodilatadoras; como resultado del vasoespasmo arteriolar que disminuye el volumen plasmático circulante, esto se traduce en hemoconcentración y por tanto el péptido natriurético auricular está aumentado para compensar el vasoespasmo, hay signos de coagulación intravascular diseminada en un 10% de los casos de mujeres pre eclámpicas ([LaMarca et. al. 2008](#)).

De acuerdo a las cifras de presión arterial y al grado de proteinuria, se ha clasificado a la preeclampsia en tres grupos ([Gant y Cunningham, 1995](#); [ACOG 2002](#)):

- A) **Preclampsia leve.** Las cifras de presión arterial son superiores a los 140/90 mmHg, edema mínimo y proteinuria menor a 1.5 g en 24 horas
- B) **Preclampsia moderada.** Las cifras de presión arterial igual o superior a los 150/100 mmHg, acompañadas de edema moderado de ambas extremidades inferiores y proteinuria entre 1.5 y 3.0 g en 24 horas
- C) **Preclampsia grave.** Las cifras de presión arterial son iguales o superiores a los 160/110 mmHg con proteinuria mayor de 5 g en 24 horas, oliguria (flujos urinarios por debajo de 30 ml/min) y/o presencia de síntomas cerebrales (obnubilación, cefalea, vómitos o visión borrosa) edema pulmonar o cianosis, dolor epigástrico o en el cuadrante superior derecho, alteración de la función hepática, trombocitopenia.
- D) **Eclampsia.** Es aquella situación en la cual existen crisis convulsivas no atribuibles a otra patología cerebral en una paciente con preclampsia.

FISIOPATOLOGÍA DE LA PRE ECLAMPSIA

Se han descrito diversos factores que se cree están implicados en la fisiopatología de la preclampsia como son los factores genéticos, inmunológicos así como un desequilibrio en la producción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, y a pesar de los múltiples estudios realizados hasta el momento, no se ha podido definir una teoría fisiopatología que explique todos los cambios generados. Existen varias teorías en base a la etiología de la pre

eclampsia, y aunque una sola no puede explicarla totalmente la combinación de dos o más de estas podría dar una respuesta a esta incógnita. Dentro de las más destacadas están la participación del óxido nítrico, agentes vasoconstrictores, estrés oxidativo, el SRA, factores dietéticos, y algunas citocinas pro inflamatorias ([Gilbert et. al. 2008](#)).

La producción de óxido nítrico (NO) que normalmente se eleva en el embarazo y está implicado en algunos de los cambios cardiovasculares normales, como la disminución de las resistencias periféricas. En la pre eclampsia se encuentra disminuida la óxido nítrico sintetasa (NOS), lo que implica el aumento de las resistencias periféricas ([Crews et. al. 2000](#)) sobretodo en riñón, crecimiento intrauterino restringido, e incremento en la morbilidad fetal, los avances en este sistema en particular son muy pocos debido a la dificultad de manejar el sistema del NO. A pesar de esto existen diferentes teorías acerca de la depleción de la NOS, como son la disminución de la L – arginina lo que causa una sobreexpresión de la arginasa II pudiendo orientar la función de la NOS hacia otras especies oxidantes en placenta ([Noris et. al. 2004](#)); otros han reportado que el aumento en las concentraciones de arginina en plasma puede activar la producción tanto peroxinitritos y superóxidos y contribuir al estrés oxidativo que se presenta en la pre eclampsia ([McCord et al. 2005](#)); se han reportado moléculas como el ADMA (asymmetrical dimethylarginine) presenta una elevada concentración antes de que inicie el cuadro inicial de la pre eclampsia y que pueden funcionar como inhibidores de la NOS y participar en las condiciones fisiopatológicas de la pre eclampsia ([Speer et. al. 2008](#)).

Otras investigaciones se han enfocado al estrés oxidativo, y un desequilibrio en las moléculas prooxidativas y antioxidantes resultando en una disfunción endotelial. Una de las moléculas reportadas al día de hoy es la NAD(P)H, es una molécula importante en la capacidad oxidativa de los neutrofilos, células endoteliales de vasos, y citotrofoblastos, se ha reportado que hay un incremento de estas moléculas en el trofoblasto y en células de musculo liso vascular de la placenta de mujeres con pre eclampsia ([Rajimakers et. al. 2004](#)), mas aun en este estudio se realizo un estudio coparativo entre el estrés oxidativo provocado por el NAD(P)H entre mujeres previamente hipertensas y mujeres pre eclámpticas y se observo un aumento en el NAD(P)H en estas últimas, lo que habla del estrés oxidativo en la placenta y su participación la pre eclampsia. Así mismo hay estudios enfocados en la participación de moléculas antioxidantes como la vitamina c, vitamina A vitamina E, betacarotenos, y glutati6n en mujeres con embarazo normal y con pre eclampsia (LaMarca et. al. 2008), y se reporto que hay una disminuci6n importante de algunas de estas moléculas en la pre eclampsia, y esto provoca que haya un decremento en la modulaci6n de la NOS en la respuesta contráctil de vasos mesentéricos.

Estudios realizados con respecto a la endotelina (ET) han demostrado que esta es más selectiva, ya que únicamente la ET – 1 participa en la fisiopatología de la pre eclampsia, ya que solo un bloqueador selectivo de esta produjo cambios significativos en la presión arterial media de ratas pre eclámpticas, en comparaci6n con la ET_A ([Alexander et al 2001](#)).

Algunas moléculas como la interleucina 6 (IL – 6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF – α) han presentado una elevación sustancial durante la pre eclampsia, y el bloqueo de estas disminuye la presión arterial en ratas pre eclámpticas ([LaMarca et. al. 2005](#), [Godonski et. al. 2006](#)), así como la administración de concentraciones similares a las presentadas por mujeres pre eclámpticas en ratas embarazadas sanas produce la elevación de la presión arterial, disminución del flujo sanguíneo renal, y disminución de la fracción de filtración glomerular ([LaMarca et. al. 2005](#)).

El sistema renina angiotensina parece ser algo más complejo, ya que durante el embarazo normal a pesar de haber un aumento en la producción de Ang II, hay disminución de la presión arterial, esto debido a una modificación en la expresión de receptores AT₁ y AT₂, perseverando los AT₂ sobre los AT₁, obteniendo así el efecto antihipertensivo característico en el embarazo normal, durante el embarazo con preclampsia este efecto no se presenta y hay un aumento en los receptores AT₁ ([Anguiano et. al.2007](#)), mas aun el sistema por si solo puede desencadenar la activación de algunas de las moléculas antes mencionadas sobretodo de las IL – 6, TNF – α , así como la liberación de Ca por parte de las células endoteliales de musculo liso vascular ([LaMarca et. al. 2005](#)).

Se ha propuesto que, la fisiopatología de la preclampsia ocurre en dos estadios: 1) reducción de la perfusión placentaria, y 2) el síndrome clínico materno fetal ([Babbette D. et al., 2009](#)).

La implantación anormal e isquemia placentaria son dos de las teorías mas aceptadas para el desarrollo de preclampsia ya que esta teoría involucra varios factores como son:

- Inadecuada invasión del trofoblasto en las arterias espirales del útero.
- Cambios en el flujo de sangre que llega la placenta ya sea en las arterias espirales o en las arterias uterinas.
- Incremento en la resistencia periférica basal de la placenta que ocasiona un flujo sanguíneo disminuido hacia las arterias umbilicales. (Berthold, 2008).

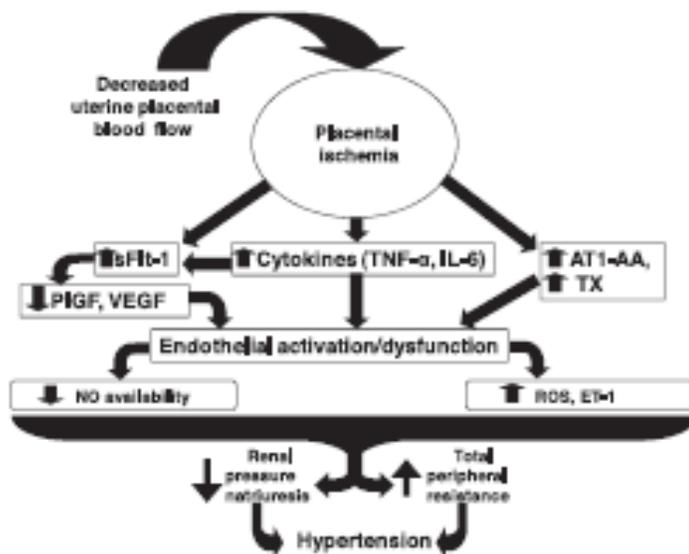


Figura 6. esquema de la interacción de las diferentes teorías de la preclampsia asociadas a la isquemia feto placentaria (Gilbert et. al. 2008).

Otra de las razones por las que la isquemia feto - placentaria es la teoría más aceptada, es porque esta involucra la participación de la mayor parte de los

componentes antes mencionados, esta interacción originada de sustancias es inducida por un efecto de inicio multifactorial, pero que da una posible respuesta a una gran cantidad de incógnitas presentes en la fisiopatología de la pre eclampsia (Gilbert et. al. 2007).

Con estos antecedentes, se describe la posible participación del RPR implicado en el desarrollo de la hipertensión arterial, por lo que, resulta de gran interés estudiar su presencia de este receptor en el desarrollo de la pre - eclampsia.

JUSTIFICACIÓN

El embarazo es un estado fisiológico caracterizado por una disminución de la reactividad vascular a agonistas como Ang II, efecto que se invierte en la hipertensión inducida durante el embarazo o la preclampsia. Se considera a la pre - eclampsia ser una de las principales causas de mortalidad materno infantil, caracterizado por la elevación de la presión arterial, proteinuria y edema. Se han descrito diversas teorías acerca de la fisiopatología de la preclampsia refiriendo un aumento de la activación del SRA – A (Shah et. al., 2005).

Recientemente investigaciones como la de Ichita y cols en el 2006 describen de manera importante el papel de la unión de la pro – renina y el RPR en el desarrollo de la hipertensión arterial. Sin embargo existe muy poca información acerca de si su presencia y/o modificación durante el embarazo constituya un mecanismo fisiopatológico importante que pudiera explicar al menos parte la elevación de la presión arterial en la preclampsia. Por lo tanto, en el presente

trabajo pretendemos analizar la expresión del receptor a renina / pro – renina durante el embarazo y embarazo con preclampsia en tejido cardíaco de rata, y así obtener información acerca de la fisiopatología de este padecimiento.

HIPÓTESIS.

Durante el embarazo con preclampsia se aumenta la expresión del RPR en el tejido cardíaco.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del RPR durante el embarazo normal y con preclampsia en un modelo de coartación aortica subrenal en rata (CASR).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reproducir el modelo de hipertensión inducida en el embarazo como modelo de pre eclampsia mediante CASR.
- Determinar la expresión proteica y génica del RPR mediante Inmunoblot y RT PCR tiempo real, en tejido cardíaco de embarazo normal.
- Determinar la expresión proteica y génica del RPR mediante Inmunoblot y RT PCR tiempo real, en tejido cardíaco de embarazo complicado con preclampsia.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Se usaron Ratas wistar hembras de 250 gr \pm 20 gr, en condiciones similares de luz/oscuridad, con libre acceso a agua y alimento, las cuales fueron divididas en 3 grupos experimentales:

1. No embarazadas con cirugía simulada (SHAM) (n=6) (**NE SHAM**)
2. Embarazadas (con cirugía simulada) (n=6) (**EMB SHAM**)
3. Embarazadas con coartación aórticas subrenal (preeclampsia) (n=6) (**EMB CASR**)

En todos los casos, una vez que se sacrificaron a los animales se extrajo el corazón y fue pesado para determinar el índice cardiaco, posteriormente fue seccionado en 4 en los segmentos: aurícula izquierda, aurícula derecha, septúm, y pared ventricular izquierda, para determinar la expresión génica y proteica.

METODOLOGÍA

REPRODUCIR EL MODELO DE PREECLAMPSIA MEDIANTE CASR

Los grupos animales que fueron sometidos a CASR, previa anestesia con éter etílico inhalado en una cámara de gas, los animales fueron afeitados y realizando técnicas quirúrgicas estériles se realizó una incisión de 2 cm en la línea media abdominal a aproximadamente 1 cm por debajo del apéndice xifoides, una vez localizada y disecada la aorta abdominal por debajo de la bifurcación de las

arterias renales se anudo con hilo de seda calibre 000 y ayudados de una aguja de acero calibre 26 angulada a 45°, de manera distal reduciendo aproximadamente en 60% el flujo sanguíneo de la aorta a partir de la anudación, se retiro la aguja y se cerró la pared abdominal, se permitió un periodo de recuperación de 15 días para su posterior apareamiento y utilización. El modelo de CASR fue descrito por primera vez en perras embarazadas ([Abitbol et. al 1982](#)); posteriormente fue retomado para otras especies como conejo, en el caso de las ratas fue descrito y validado previamente ([Bobadilla et. al. 2001](#)).

Posterior al periodo de recuperación, se colocaron las ratas hembras (3 ratas) por cada macho competente, durante 4 días, y confirmando el embarazo con un frotis vaginal en el que se observaron espermatozoides en el tapón mucoso del canal vaginal. En todos los casos se usaron las ratas hacia la tercera semana del embarazo.

En el caso de las ratas SHAM, se realizo el procedimiento quirúrgico del mismo modo, pero no se anudo la aorta abdominal, se permitió los 15 días de recuperación antes de colocarlas con el macho para su apareamiento y continuar con los procedimientos.

MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

A todos los grupos se les tomo la presión arterial, los grupos de ratas no embarazadas en cualquier fase del ciclo estral, y en el caso de las ratas embarazadas indistintamente se les tomo en la última fase del tercer trimestre del embarazo. En todos los casos el procedimiento fue el mismo, se atempero a la rata en un ambiente cálido para provocar una vaso dilatación arterial, colocando a la rata en un cepo para su inmovilización (previo entrenamiento en los cepos 10 min 3 veces al día por lo menos 4 días previos al día de la medición), se coloco un transductor de presión en la cola de la rata el cual detecto pulso de la arteria caudal, y este a su vez estuvo acoplado a un sistema de detección electrónica (método pletismográfico), y se obtuvieron los siguientes datos: presión sistólica, presión diastólica, y frecuencia cardiaca ([LETICIA; Panlab, Barcelona, España](#)).

MEDICIÓN DE PROTEINURIA

Indistintamente se colocaron a todos los grupos de ratas en cajas metabólicas durante 2 días, tomando el primer día como adaptativo, y el segundo día se recolecto la orina, se midió el volumen, y se tomaron muestras de esta para la medición de proteinuria por el método de Bradford modificado ([Bradford 1976](#)), se leyó a una absorbancia de 595 nm en un lector de ELISA MICROPLATE de BIORAD. Con los datos obtenidos se realizo una curva en EXCEL 2010 de Microsoft Office, y por extrapolación se obtuvo la concentración final de proteínas en las muestras, empleando la ecuación de la regresión lineal obtenida en una curva de calibración.

INMUNOBLLOT

Los diferentes segmentos de tejido cardiaco obtenidos de los grupos experimentales, fueron homogenizados con un homogenizador (TISSUE TEAROR, de BIOSPEC PRODUCTS, inc USA), en 1 ml de TRIS – HCl 0.1 M a pH 7.4 que contenía inhibidores de preteasas mini complit a una velocidad de entre 14 000 y 16 000 rpm durante 4 min a 4°C. Una vez homogenizados las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm por 20 min a 4°C, con el sobrenadante se formaron alícuotas de 100 μ l y almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Determinación de concentración de proteínas.

Para la determinación de proteínas se utilizo el método colorimétrico de lowry (Lowry, 1951) el cual en un medio ligeramente alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato (Lowry. et. al. 1951).

La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso ([Lowry, et. al. 1951](#)).

Procedimiento:

Se realiza una curva de calibración usando una alícuota de albumina sérica bobina de 0.5 mg /1ml, y realizando diluciones para obtener concentraciones de proteínas 5, 10, 15, 20 30, 40, 45, 50 µg/ml de proteína, con un volumen de 200 µl, al mismo tiempo se realizaron diluciones 1:100 de las muestras a determinar. Una vez realizadas las diluciones correspondientes se realizaron las soluciones C y D, a partir de la solución A y B y de FOLIN 2N (ver más adelante) protegiéndolas de la luz y colocándolas a 4°C hasta su utilización. A cada una de las diluciones se le colocó 1 ml de solución C, dejando reposar 10 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación con la solución C se colocaron 100 µl de solución D, dejando reposar 30 min a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se colocaron en celdillas para leer en el espectrofotómetro ([JENway 6300 spectrophotometer](#)) a 750 nm en luz visible. Con los datos obtenidos se creó una curva de regresión lineal con EXCEL de Microsoft office y por extrapolación se

determino la concentración real de proteínas por micro litro en cada una de las muestras.

ELECTROFORESIS

Para realizar la electroforesis se realizaron las alícuotas de 100 μ l con 11 μ l de buffer de carga, se hirvieron a 100°C durante 10 minutos colocando inmediatamente a 4°C. Las muestras fueron colocadas en los pocillos de geles de acrilamida al 10 % cargando una cantidad constante de proteína (200 μ g proteína) de cada muestra y 4 μ l de un marcador de peso molecular (fermentas PageRuler prestained protein) en una cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X. La electroforesis fue realizada a 88 mv durante 120 minutos con una fuente de poder BioRad PowerPac 200.

TRANSFERENCIA

Antes de que termine la electroforesis se realiza el buffer de transferencia y se colocan en el papel filtro y se mantiene a 4°C hasta su utilización, se toma la membrana PVDF y se coloca en metanol puro para su activación manteniéndolo a 4°C hasta su utilización. 5 minutos antes de que termine la corrida, las membranas de PVDF se colocan en el buffer de transferencia para retirar el exceso de metanol. Una vez que termino el tiempo de corrida, se retiran los vidrios dejando el gel, se retira el exceso de buffer del papel filtro y se colocan en la cámara de

transferencia (BioRad TransBlot SD SemiDry transfer cell), se colocan en el siguiente orden:

1. papel filtro
2. membrana de PVDF
3. gel que se le realizo la electroforesis
4. papel filtro

BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPO

Al termino de la transferencia las membranas de PVDF fueron bloqueadas con leche baja en grasas (Svelty) al 5% y albumina al 1% re suspendida en solución TBS Tween durante 2 hrs. Una vez terminado el proceso de bloqueo se agrego el anticuerpo policlonal para RPR (Goat policlonal to ATP6IP2 (ab5959) de abcam, EUA) realizando una dilución 1:7500 incubando toda la noche en agitación leve continua a 4°C. Terminado este tiempo se realizan 3 lavados de las membranas de PVDF con TBST en agitación gentil durante 10 minutos cada uno. Se colocó posteriormente el anticuerpo secundario (rabbit – antigoat de IgG (H+L) HRP conjugate, invitrogen), a una dilución 1:10 000 durante 2 hrs. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST.

REVELADO

Las membranas se incubaron con el sustrato quimioluminiscente usando luminol ([western Blotting Luminol Reagent \(sc – 2040\)](#) de [Santa Cruz biotechnology](#)) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente fueron colocadas en la cámara de amplificación durante 15 min en contacto directo con película sensible a luz ([Amersham hyperfilm ECL](#) de [GE healthcare limited](#)). A continuación se sumergieron las películas en revelador ([Kodak profesional d-19](#)) durante 30 segundos y en fijador, se dejó secar la película para su posterior análisis.

DETECCIÓN

La intensidad de las bandas se midió escaneando las bandas con un escáner ([scanjet G3110](#) de [HP](#)), y la densitometría se realizó empleando un software de análisis de imágenes ([Quantity One 1 – D Imagen Análisis Software](#); [BioRad](#)), realizando el análisis densitométrico normalizado con beta actina de las mismas muestras.

RT PCR REAL TIME

Obtención de RNA

Una vez obtenidos los tejidos seccionados del corazón muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. Se colocaron 50 mg de tejido cardiaco con 1 ml de TRIZOL (INVITROGEN), y se homogenizaron con un homogeneizador (TISSUE TEAROR, de BIOSPEC PRODUCTS, inc USA) durante 4 minutos a 16 000RPM. Posteriormente se centrifugo a 12 000 RPM por 15 minutos 4°C, se obtuvo el sobrenadante y se desecha el resto, al sobrenadante se le agregaron 200µl de cloroformo puro, se agitaron por 15 segundos y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugaron nuevamente a 12 000 RPM por 15 minutos 4°C, obteniendo 3 fases de las cuales la fase acuosa corresponde al RNA, la interface corresponde al DNA, y la fase más densa corresponde a proteínas presentes en la muestra; se obtuvo la fase sobrenadante con cuidado de no tocar la interface y se transfiere a un tubo limpio y estéril. Se añadieron 500 µl de isopropanol puro dejando incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugo a 12 000 RPM por 10 minutos a 4°C. Se desecho el isopropanol con cuidado de no desechar el pellet resultante, se colocó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugo a 8000 RPM por 10 min 4°C, del resultado se desecha el etanol con cuidado de no desechar el pellet, dejando secar durante 15 minutos. Por último se re suspende el RNA en 25 µl de AGUA – DEPC y se incubo por 30 minutos a 55°C.

AMPLIFICACIÓN DEL cDNA

Para la amplificación de cDNA se colocaron 2 ml de RNA obtenido de las muestras, las cuales fueron colocados con 5 ml 10X MMLV RT Buffer y 5 ml de DTT 0.1M, dejando en incubación a 65°C por 10 minutos. Inmediatamente después fueron colocados a 4°C para colocar 10 µl de dNTP Mix (2.5 mM) 0.5 µl de oligo (dT), 1 µl de poly – A selected mRNA, y 25 U MMLV RT, obteniendo un volumen total de 50 µl, se incubo en secuencia a 25°C por 10 minutos, posteriormente 65° por 30 min y por ultimo a 85° por 5 min. Colocando inmediatamente después a 4°C. El resultado obtenido fue cDNA.

Los oligos utilizados para la cuantificación son AB188298.1|AB188298:EMBL|TRAN00000020729:ASTD Rattus norvegicus mRNA for renin/prorenin receptor, complete cds (acesolab) . Estos son diseñados para acoplarse a la secuencia del intron >AB188298.1|AB188298:EMBL|TRAN00000020729:ASTD en la secuencia especifica del gen 5'gtgcttagcgaatgaatttagc3' como se muestra en la figura .

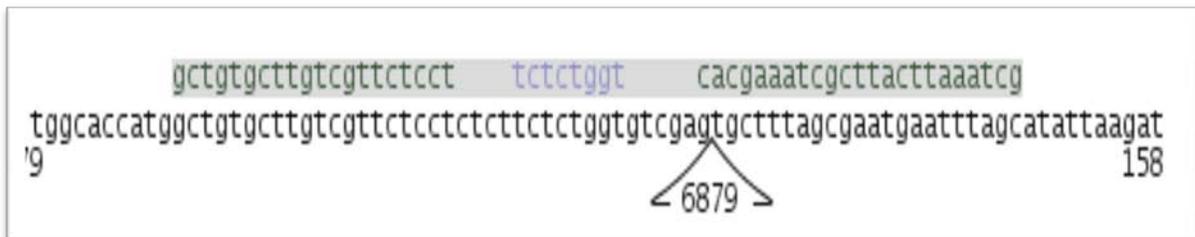


Figura 6: Segmento de la secuencia del mRNA codificante para RPR, donde se muestra el sitio de unión de los oligos utilizados en la técnica de RT PCR – Real Time. Mostrando el intron

El cDNA obtenido, fue utilizado según las especificaciones de LigthCycler (1.5 Roche), colocando 3 ml de cDNA, 5.9 ml de agua MiliQ, 0.5 ml de oligo R específico para RPR , y 0.5 ml de oligo F para RPR. 0.1 ml sonda. Posteriormente se colocaron en capilares a 4°C y se centrifugaron a 2000 rpm. Se colocaron en el lector LigthCycler programando de la siguiente manera:

Programa	temperatura	mantenimiento	rango de temperatura
	(°C)	(s)	(°C/SEC)
Pre – incubación	95°C	600	4.4
Amplificación		10	
Segmento 1	95°C	15	4.4
Segmento 2	60°C	15	2.2
Segmento 3	72°C	10	4.4
Enfriamiento	40°C		1

El resultado fue una curva de amplificación para RPR y para 18S como normalizador. Los cuales fueron utilizados en el análisis estadístico para determinar la cantidad de mRNA para RPR presente en los diferentes segmentos de los grupos experimentales.

LISTA DE SOLUCIONES

SOLUCIONES LOWRY

Solución A:

- Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0,1 M

Solución B:

- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%, tartrato sódico-potásico al 2%

Solución C:

- Se colocan 49 ml de solución A y 1 ml de solución B para un volumen final de 50 ml, se realizaron los ajustes para obtener un volumen acorde al número de muestras a medir en cada ocasión.

Solución D

- A partir de FOLIN 2 N se realiza una dilución al 50% con agua para obtener FOLIN 1 N.

SOLUCIONES ELECTROFORESIS

Buffer de corrida, solución stock 10X (1000ml):

- Tris HCl 30 gr
- Glicina 144 gr
- SDS 10 gr
- Agua aforar 1000 ml en un matraz aforado.

SOLUCIONES TRASFERENCIA

Buffer de transferencia, solución stock 10 X (1000ml):

- Tris – HCl 30 gr
- Glicina 144 gr
- Agua aforar a 1000ml en un matraz

aforado.

Buffer de transferencia 1X (200 ml)

- Solución stock de buffer de transferencia 10X 20 ml
- Agua miliQ 140 ml
- Metanol o alcohol metílico 40

ml

- Nota: es importante hacerlo en ese orden para evitar la precipitación del buffer.

SOLUCION TBS 10 X. (1000ml)

- Trizma – Base o triz HCl 15.76 gr
- NaCl 89 g
- Disolver en un volumen menor y posteriormente ajustar pH

con HCl o NaOH hasta 7.4, posteriormente completar volumen a 1000 ml.

SOLUCION TBS – tween 1 X(1000 ml)

- TBS 100 ml
- Agua miliQ 900 ml
- Tween 20 1 ml

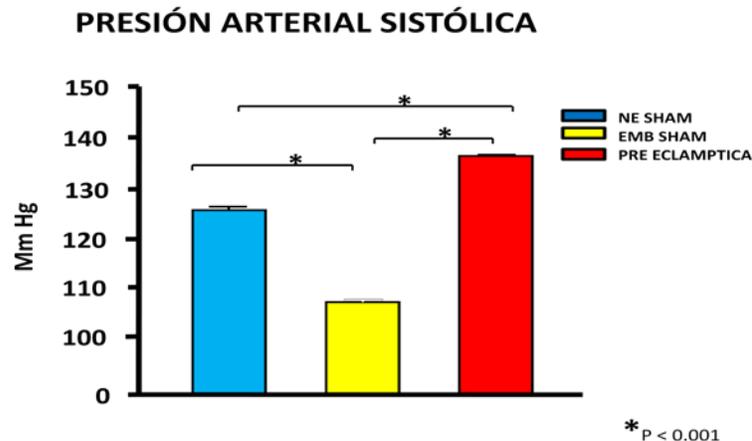
RESULTADOS

CARACTERIZACION DEL MODELO DE PREECLAMPSIA

MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA.

Con el fin de determinar si el modelo de CASR reproduce todos los parámetros clínicos de la preeclampsia se midió tanto en grupos control como gestantes y ratas preclámpticas la presión arterial sistémica en la cola de la rata por el método pletismográfico no invasivo. La PAS se midió al final del tiempo de recuperación tras el procedimiento de CASR simulado en el grupo control, así como, y al final de la 3ª semana de la gestación para los grupos gestantes y ratas preclámpticas.

En la gráfica 1 se observa que, efectivamente el embarazo disminuye significativamente la PAS con respecto al grupo control, y que la isquemia inducida por el procedimiento de CASR en la rata embarazada incrementa significativamente la PAS comparado con el grupo de ratas embarazadas sanas.

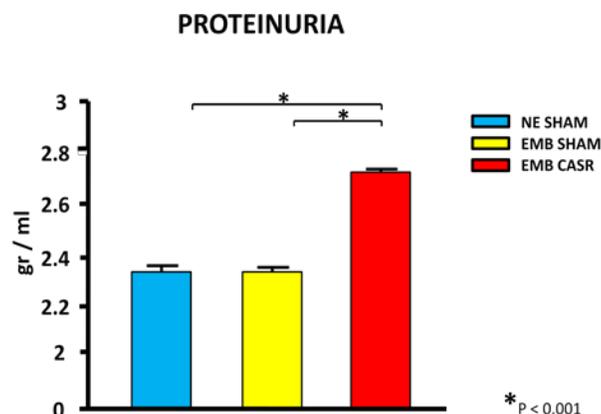


Grafica 1. Medición de la Presión Arterial Sistólica (PAS) en mmHg en la cola de la rata por el método pletismográfico en los grupos control, Embarazada SHAM y ratas Preeclámpticas, cada grupo representa la \pm media error estándar de una n=6 experimentos *p<0.05. Análisis estadístico ANOVA de una vía y contraste de medias con la prueba de Bonferroni.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN ORINA DE 24h

Posteriormente a los 15 días de recuperación del procedimiento de CASR, las ratas de los diferentes grupos de estudio fueron colocadas de manera individual en jaulas metabólicas para la recolección de orina. Todos los animales permanecieron 24 h en las en las jaulas metabólicas para tener un periodo de adaptación. Posterior a este periodo se recolectaron 2ml de orina de 24 hrs y se almacenaron a -80°C para realizar la cuantificación de proteína en orina una vez recolectadas todas las muestras de estudio.

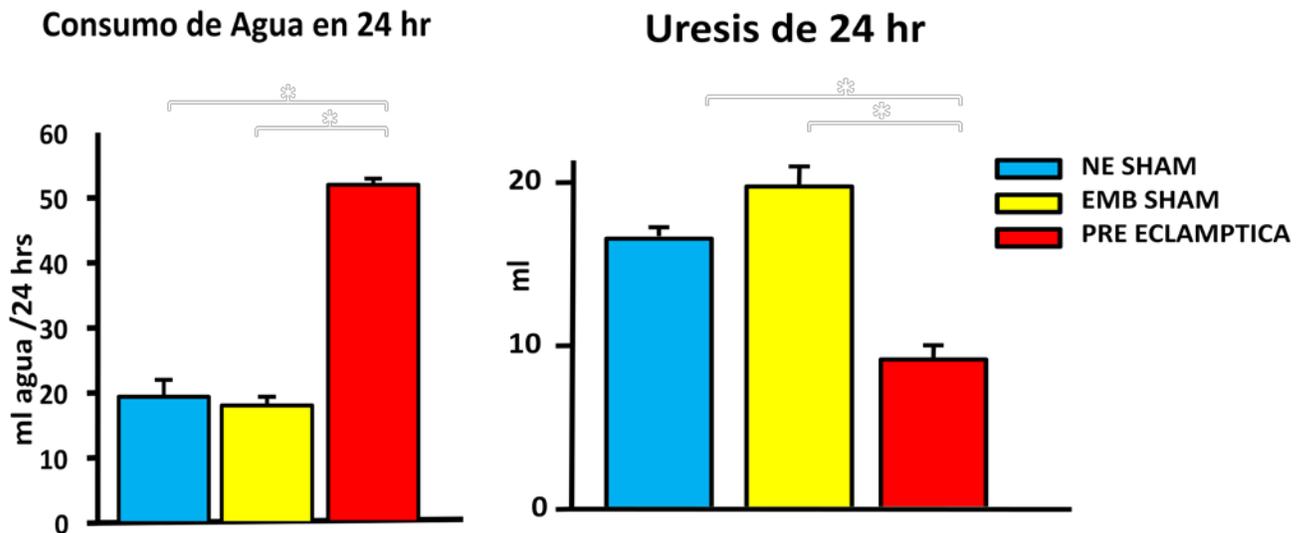
Se determinó en cada muestra la concentración de proteína en orina encontrando los siguientes resultados: En existe una excreción normal o fisiológica de proteína en la orina de ratas sanas, valores muy semejantes a los encontrados en el grupo de ratas embarazadas, en cambio, se observó, un incremento en la excreción urinaria proteica de las ratas preeclamapticas como lo demuestra la gráfica 2.



Gráfica 2. Excreción de proteínas en orina de 24 hr en los grupos control, Embarazada SHAM y ratas Preclampticas, cada grupo representa la \pm media error estándar de una $n=6$ experimentos $*p<0.05$. Análisis estadístico ANOVA de una vía y contraste de medias con la prueba de Bonferroni.

CONSUMO DE AGUA Y URESIS EN 24 h

Para comprobar si el modelo de CASR inducía otro parámetro clínico de la preeclampsia: el edema, éste se determinó indirectamente cuantificando el consumo de agua y uresis de 24 h. La gráfica 3 y 4 muestran que, las ratas preeclampticas consumen más agua ($51.5 \text{ ml} \pm 5.2 \text{ ml}$) comparado con las ratas embarazadas ($20.2 \text{ ml} \pm 3.2 \text{ ml}$) y el grupo control ($19.2 \text{ ml} \pm 2.1 \text{ ml}$). Así mismo, se observó una uresis significativamente disminuida en las ratas preeclampticas ($9.2 \text{ ml} \pm 1.7 \text{ ml}$) con respecto al embarazo sano ($19.5 \text{ ml} \pm 1.7 \text{ ml}$) y el grupo control ($16.8 \text{ ml} \pm 1.3 \text{ ml}$). Estos resultados podrían explicar que, la ganancia de peso en el grupo de las ratas preeclampticas podría ser atribuido a edema.



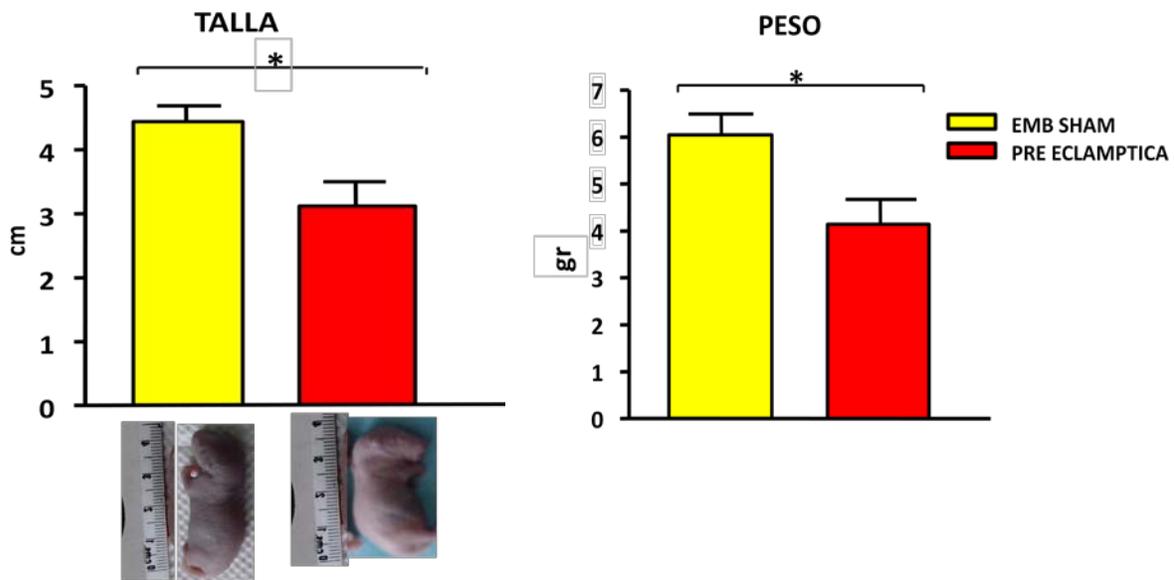
Gráfica 3 y 4. Cuantificación de ingesta de agua y uresis de 24hrs en los grupos control, Embarazada SHAM y ratas Preeclampticas, cada grupo representa la \pm media error estándar de una n=6 experimentos *p<0.05. Análisis estadístico ANOVA de una vía y contraste de medias con la prueba de Bonferroni.

RETRASO EN EL CRECIMIENTO INTRAUTERINO

Otro de los parámetros clínicos a evaluar en el modelo de preeclampsia fue, el retardo en el crecimiento intrauterino inducido por isquemia fetoplacentaria por el procedimiento de CASR en la rata.

Como se observa en la gráfica 5 y 6, las crías de las ratas con CASR presentaron baja talla y retardo en su crecimiento intrauterino al compararse con el de las crías de las ratas sujetas a operación simulada (ratas Emb SHAM).

Con todos estos resultados hasta este momento demostramos que, el procedimiento de CASR en la rata ocasionó la elevación de la PAS, proteinuria, edema y retardo en el crecimiento de las crías, por tanto nuestro modelo funciona como un modelo de preeclampsia.

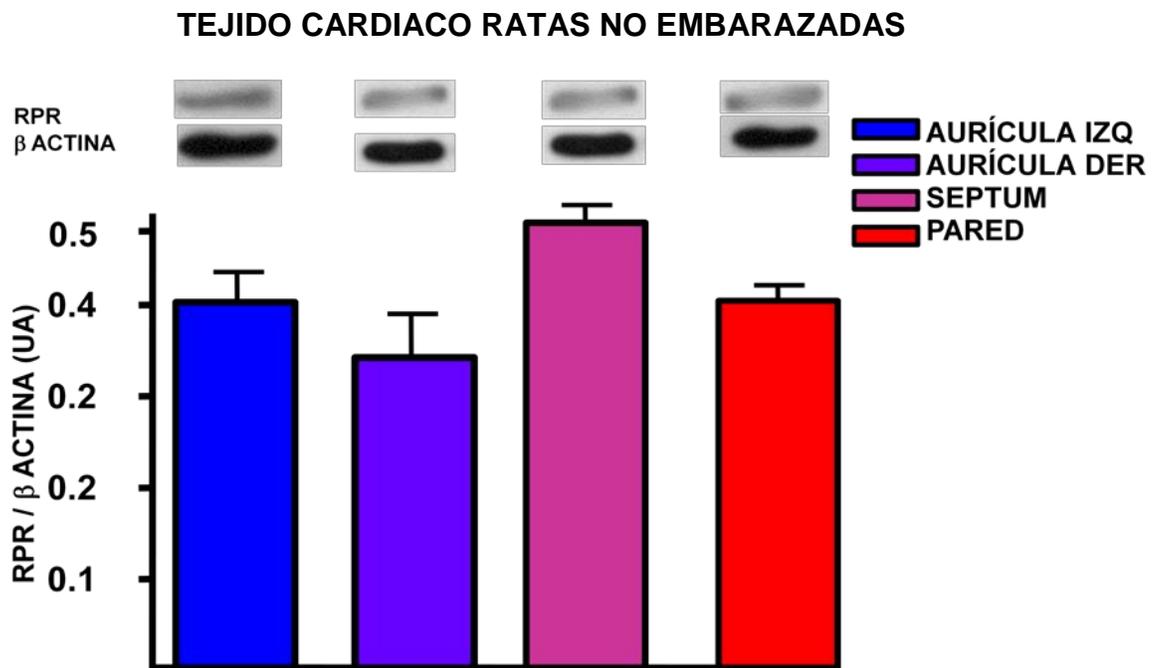


Gráfica 5 y 6. Medición de talla y peso de las crías de los grupos Embarazada SHAM y ratas Preclámpticas, cada grupo representa la \pm media error estándar de una n=6 experimentos *p<0.05. Análisis estadístico ANOVA de una vía y contraste de medias con la prueba de Bonferroni.

INMUNOBLOT

EXPRESIÓN PROTEICA BASAL CARDIACA DEL EN RATAS NO EMBARAZADAS

Los resultados obtenidos en la expresión proteica del RPR en los diferentes segmentos de corazón en rata sana demostraron su presencia en los segmentos estudiados, también se observó, que existen ligeras diferencias no significativas entre los segmentos estudiados, se observa que hay una mayor expresión en el septum, y una menor expresión en la aurícula derecha, estos resultados se analizarán más adelante.



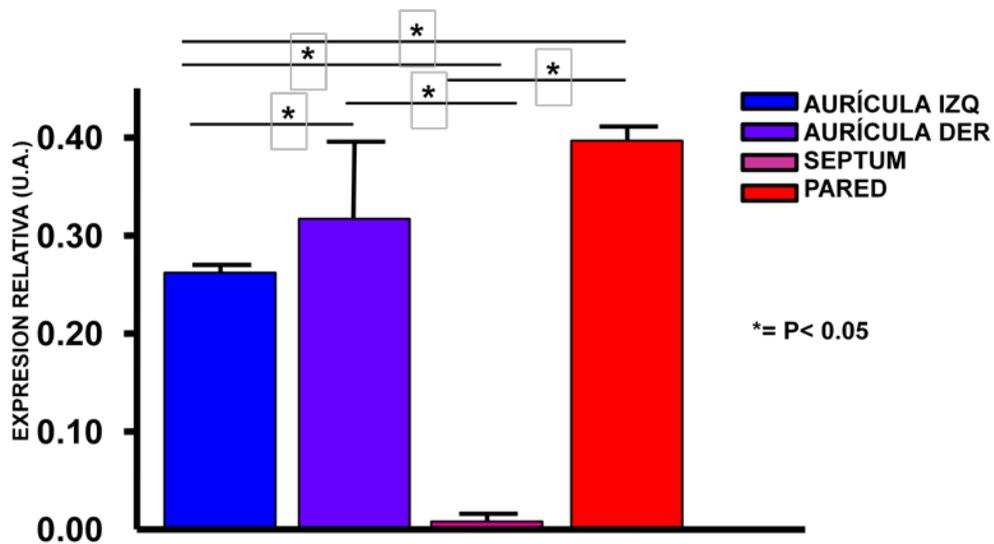
Grafica 7. Expresión proteica del RPR en los segmentos, aurícula izquierda, aurícula derecha, septum , y pared ventricular izquierda en ratas sanas, realizados en una N = 6 para posteriormente realizar un análisis con una ANOVA de una vía con Bonferroni.

RT PCR TIEMPO REAL

EXPRESIÓN GENICA BASAL CARDIACA DEL RPR EN RATAS NO EMBARAZADAS

Los resultados obtenidos en la expresión génica del RPR en los diferentes segmentos de corazón en rata sana demostraron su presencia en los segmentos estudiados, también se observó, que existen diferencias significativas entre la expresión de los segmentos estudiados, se observa que hay una mayor expresión en pared ventricular izquierda, y una menor expresión en el septum, los resultados aquí obtenidos contrastan con los resultados en la expresión proteica, estos resultados se analizarán más adelante para tratar de dar una explicación a esta discordancia.

TEJIDO CARDIACO RATAS NO EMBARAZADAS



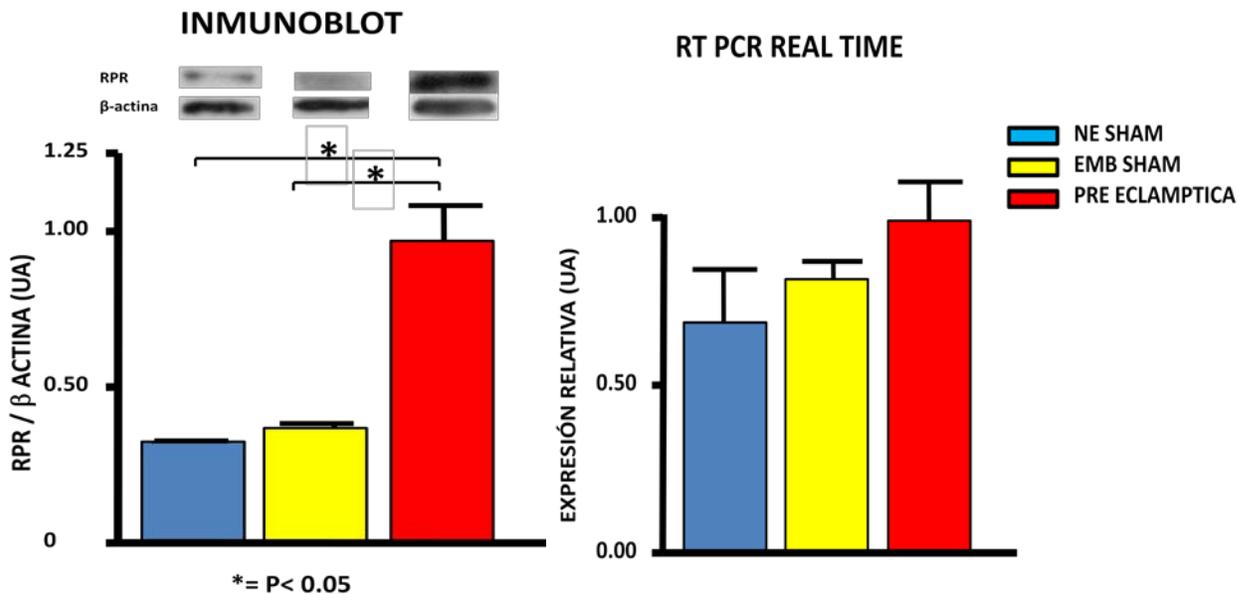
Grafica 8. Expresión génica del RPR en los diferentes segmentos de corazón estudiados, aurícula izquierda, aurícula derecha, septum, y pared ventricular izquierda, realizados en una N = 3 para cada segmento, posteriormente se realizó un análisis con una ANOVA de una vía con Bonferroni

INMUNOBLOT y RT PCR TIEMPO REAL

AURÍCULA IZQUIERDA

Los resultados obtenidos en la expresión proteica del RPR en segmento de la aurícula izquierda no muestran modificaciones en el tejido de ratas embarazadas SHAM con respecto al control de ratas NE SHAM, mientras que la expresión proteica del tejido de ratas pre eclámpticas hay un aumento significativo con respecto a sus dos grupos control. Los resultados en la expresión génica del RPR en el segmento de la aurícula izquierda muestran una tendencia similar a la expresión proteica, sin presentar diferencias significativas.

AURÍCULA IZQUIERDA

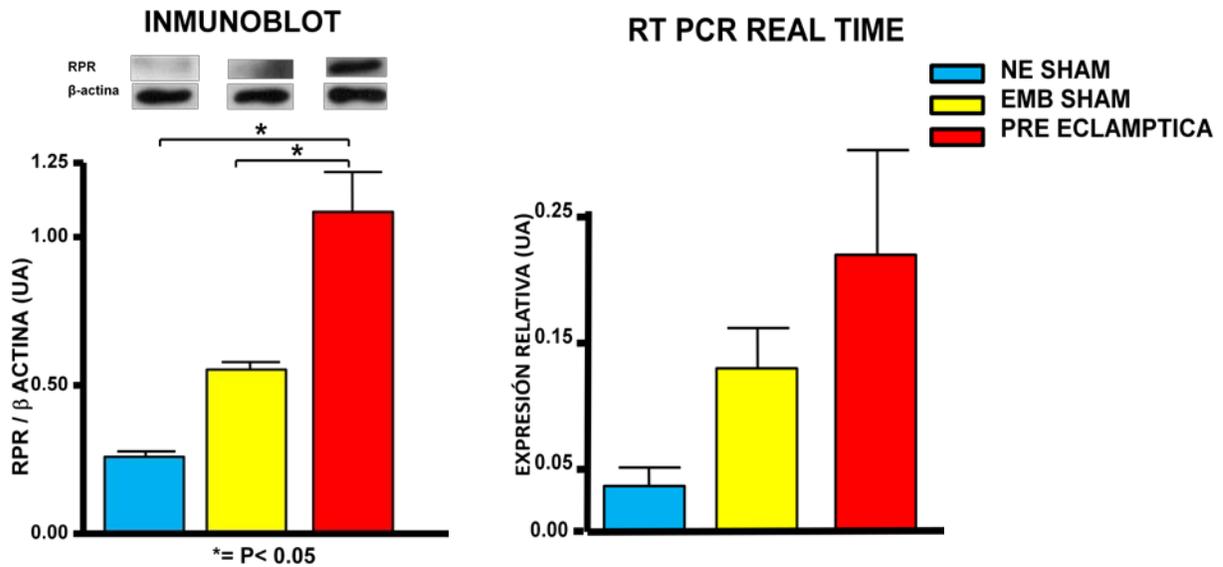


Gráficas 9 y 10. Expresión proteica y génica (respectivamente) del RPR en el segmento de aurícula izquierda, en ratas NE SHAM, ratas embarazadas SHAM y embarazadas con CASR, realizados en una N = 6 y N = 3 respectivamente para realizar el análisis con una ANOVA de una vía con Bonferroni.

INMUNOBLOT y RT PCR TIEMPO REAL

AURÍCULA DERECHA

Los resultados obtenidos en la expresión proteica del RPR en segmento de la aurícula derecha no muestran modificaciones en el tejido de ratas embarazadas SHAM con respecto al control de ratas NE SHAM, mientras que la expresión proteica del tejido de ratas pre eclámpticas hay un aumento significativo con respecto a sus dos grupos control. Los resultados en la expresión génica del RPR en el segmento de la aurícula derecha muestran una tendencia similar a la expresión proteica, sin presentar diferencias significativas entre sí.



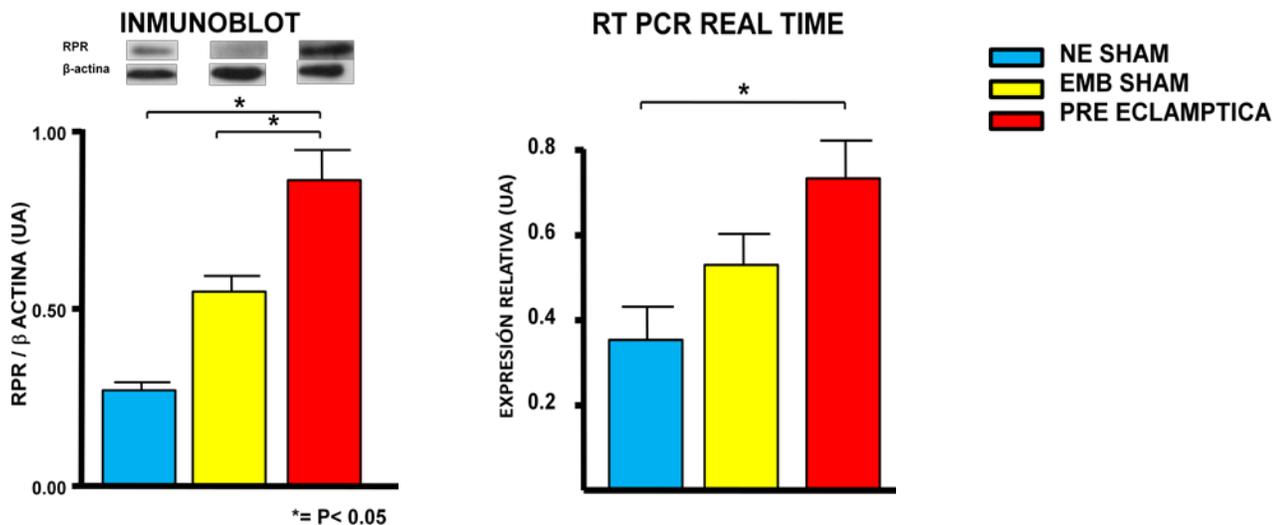
Graficas 11 y 12 . Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento de auricula derecha, en ratas NE SHAM, ratas embarazadas SHAM y embarazadas con CASR, realizados en una N = 6 y N = 3 respctivamente, para realizar el analisis con una ANOVA de una vía con Bonferroni.

INMUNOBLOT y RT PCR TIEMPO REAL

SEPTUM

Los resultados obtenidos en la expresión proteica del RPR en segmento del septum no muestran modificaciones en el tejido de ratas embarazadas SHAM con respecto al control de ratas NE SHAM, mientras que la expresión proteica del tejido de ratas pre eclámpticas hay un aumento significativo con respecto a sus dos grupos control. Los resultados en la expresión génica del RPR en el segmento del septum muestran una tendencia similar a la expresión proteica, presentando una diferencia significativa entre el grupo de ratas pre eclámpticas en comparación del grupo de NE SHAM, concordando con los resultados obtenidos en los estudios de inmuno blot.

SEPTUM



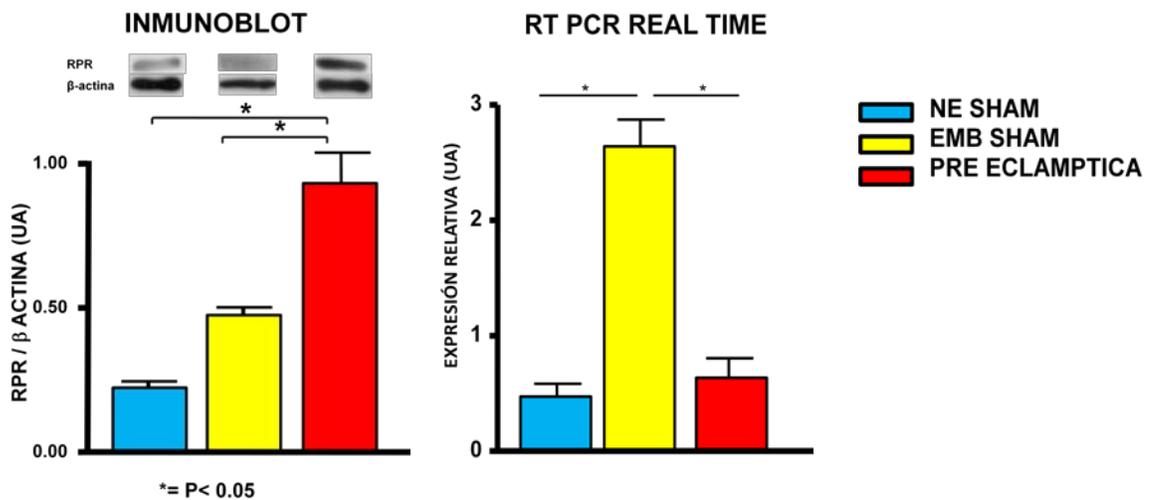
Graficas 13 y 14 . Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento del septum, en ratas NE SHAM, ratas embarazadas SHAM y embarazadas con CASR, realizados en una N = 6 y N = 3 respectivamente, para realizar el analisis con una ANOVA de una vía con Bonferroni.

INMUNOBLOT y RT PCR TIEMPO REAL

PARED VENTRICULAR IZQUIERDA

Los resultados obtenidos en la expresión proteica del RPR en segmento de la pared ventricular izquierda no muestran modificaciones en el tejido de ratas embarazadas SHAM con respecto al control de ratas NE SHAM, mientras que la expresión proteica del tejido de ratas pre eclámpticas hay un aumento significativo con respecto a sus dos grupos control. Los resultados en la expresión génica del RPR en el segmento de la pared ventricular izquierda muestran una tendencia totalmente diferente a las expresiones en los segmentos anteriores, mostrando un aumento significativo en el grupo de ratas embarazadas SHAM. Esta discordancia la discutiremos más adelante.

PARED VENTRICULAR IZQUIERDA



Graficas 15 y 16 . Expresion proteica y genica (respectivamente) del RPR en el segmento pared ventricular izquierda, en ratas NE SHAM, ratas embarazadas SHAM y embarazadas con CASR, realizados en una N = 6 y N = 3 respctivamente, para realizar el analisis con una ANOVA de una vía con Bonferroni.

DISCUSIÓN

La preeclampsia, la cual es definida como una alteración propia del embarazo que se caracteriza por elevación de la presión arterial, proteinuria y edema, en mujeres antes normotensas después de la semana 20 de la gestación, la cual puede estar acompañada con retraso en el crecimiento intrauterino y parto prematuro ([Davison et. al. 2004](#)).

En el trabajo presentado, se indujo hipertensión agregada al embarazo por disminución del flujo sanguíneo feto - placentario, resultado de la CASR utilizando el mismo principio de [Abitbol \(Abitbol. et. al. 1976; Abitbol et. al. 1977; Abitbol et. al. 1982\)](#), modificados para la rata ([Bobadilla et. al. 2001](#)). El resultado de este procedimiento fue el incremento de la presión arterial únicamente en el grupo de embarazadas con CASR, con una PAS de 134.8 ± 1.46 mmHg, en comparación con los grupos de ratas NE SHAM presento una PAS de 122.9 mmHg ± 1.78 mmHg, y el grupo de ratas embarazadas SHAM presento una disminución en la PAS 107.72 mmHg ± 2.75 mmHg lo cual concuerda con reportes anteriores en el que las ratas embarazadas sanas en la tercer semana de gestación presentan una disminución en la presión arterial la cual es revertida en el postparto ([Alexanders et. al. 1997](#)). En la medición de proteinuria encontramos que el grupo de ratas NE SHAM presento una concentración de proteínas en orina de 2.28 mg/ml ± 0.13 , la cual no se modifico significativamente en los grupos control de ratas embarazadas SHAM, mientras que el grupo de ratas embarazadas con CASR presento una elevación significativa de 2.68 mg/ml ± 0.08 , esta medición concuerda con la definición de proteinuria en la pre eclampsia de la [ACOG del 2002](#). Cabe recordar

que la rata fisiológicamente presenta un grado de proteinuria normal de 2.2 a 2.3 mg/ml ([Baker et. al. 1979](#)). Para determinar el edema en nuestros grupos funcionales medimos la ingesta de agua y uresis en 24 h, como datos de balance hídrico, observando que en nuestros grupos control de ratas NE SHAM y embarazadas SHAM presentaban una ingesta de agua de 20 ml en 24 h, y las ratas embarazadas con CASR de 50 ml en 24 h, mientras que en la uresis observamos volúmenes de 19 ml y 20 ml respectivamente mientras que las ratas embarazadas con CASR presentaron una uresis de 10 ml, lo cual podríamos interpretar como una retención de líquidos y por tanto edema ([ACOG del 2002](#)). Junto con las mediciones anteriores realizamos medimos en el peso y talla de los fetos obtenidos después de sacrificar a los grupos de ratas embarazadas SHAM y con CASR, los resultados mostraron una disminución en el peso de las crías de ratas con CASR de $5.20\text{gr} \pm 0.53\text{gr}$ en comparación con las crías de ratas SHAM que tuvieron un peso de $6.04\text{ gr} \pm 0.45\text{ gr}$; a su vez, se observó una disminución en la talla de las crías hijas de ratas con CASR con una talla de $3.99\text{ cm} \pm 0.37\text{ cm}$, en comparación con las crías de ratas SHAM con $4.44\text{ cm} \pm 0.24\text{ cm}$, ambos datos en conjunto son datos sugestivos de un retardo en el crecimiento intrauterino, dato bien definido en la preeclampsia y consecuencia de la hipoperfusión feto placentaria reportada en trabajos previos ([Abitbol et. al. 1981](#); [Jeffrey et. al. 2008](#)). Con los datos de hipertensión arterial sistólica, proteinuria edema y retardo en el crecimiento intrauterino de las crías, podemos decir que nuestro modelo de CASR funciona como un modelo de pre eclampsia.

Se observó en los resultados de inmunoblot, un aumento significativo de la expresión proteica del RPR en los 4 segmentos de corazón estudiados, aurícula izquierda, aurícula derecha, septum y pared ventricular izquierda; este aumento en la expresión proteica concuerda con estudios previos realizados en diferentes modelos de hipertensión, enfocados a diferentes órganos como corazón ([Ichihara et. al., 2006](#); [Kinouchi, et. al. 2010](#)), riñón ([krebs et. al. 2007](#)), y músculo liso arterial ([Sakoda et, al, 2007](#)), este resultado es sugestivo de que el receptor participa aumentando su expresión proteica en tejido cardíaco de forma importante en la respuesta a los cambios adaptativos del corazón en la preeclampsia.

Los resultados obtenidos en el RT PCR tiempo real, mostraron una tendencia similar a los obtenidos en el inmunoblot, a pesar de que en los segmentos de aurícula derecha y pared ventricular parecen no concordar la expresión génica a la proteica, se han realizado estudios en riñón de ratas diabéticas, en los que se han reportado un aumento proteico mayor a la expresión génica de RPR ([Siragy et. al. 2007](#)), si bien en el presente trabajo no se trata del mismo modelo y órgano, podemos tomar este dato como referencia para tratar de explicar los resultados obtenidos. Los mecanismos de esta discordancia entre la expresión proteica y génica no han sido descritos, pero hemos propuesto 2 teorías que podrían explicar esta discordancia: 1) un mecanismo postranscripcional que replique en varias ocasiones una misma cadena de RNAm para RPR; y 2) disminución en la lisis del RPR sin que se disminuya la producción, lo que conllevaría una acumulación del RPR en la célula.

Existe un caso particular en el segmento de la pared ventricular izquierda, ya que encontramos un aumento significativo de la expresión génica de RPR mientras que en la expresión proteica no se observa este aumento. Se ha observado sobretodo en animales hembras que a pesar de que haber un aumento en la expresión génica, no se ve reflejado en la expresión proteica, esto bien puede ser debido a una influencia hormonal, y siendo el embarazo un estado donde hormonas sexuales como la progesterona, y prolactina (). Esta inhibición en la expresión proteica de las hormonas sexuales de la hembra podría ser la explicación más lógica para esta discordancia, mas nos hace falta realizar estudios apropiados para terminar de dilucidar este mecanismo.

CONCLUSIONES

1. El RPR está presente en los diferentes segmentos de tejido cardiaco sano estudiados, y en diferentes proporciones, por lo que podría participar de diferentes formas según la función del segmento cardiaco en cuestión.
2. El RPR presenta una tendencia a la alza en el embarazo normal, este aumento podría estar relacionado con el cronotropismo y dromotropismo positivos presentes en el embarazo normal, permitiendo un mayor flujo de sangre, con el fin de aumentar la irrigación de la placenta y del feto.
3. El receptor aumenta significativamente durante el estado de pre eclampsia en comparación con los grupos control.

4. No siempre es concordante la expresión proteica con la expresión génica, esto debido probablemente a la influencia de hormonas sexuales del embarazo.

PERSPECTIVAS

Posterior al egreso y titulación en la maestría en ciencias con especialidad en farmacología, se pretende seguir realizando estudios en con respecto a la expresión del receptor en tejido cardíaco bajo un modelo de hipertensión inducida en el embarazo, principalmente realizando cortes histológicos, para determinar la localización celular del RPR, administrar esteroides y determinar si es que participan activamente en las discordancias entre la expresión proteica y génica del RPR en tejido cardíaco.

BIBLIOGRAFÍA

- Guadalajara, J. F., (2003). Capítulo 26. En: Cardiología. Méndez Editores. 5ª Edición. México. pp. 843 – 863
- Gant, N. F. and Cunningham, F. G. (1995). Capítulo 57. Trastornos Hipertensivos en el Embarazo. En: Manual de Ginecoobstetricia. Manual Moderno. México. pp. 545 - 551
- Shah, D. M., (2005). Role the Renin – Angiotensin System in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Am J. Physiol Renal Physiol*. 288. pp. 614 – 625
- Nguyen, G. and Danser, J. (2008). Prorenin and (pro)renin Receptor a Review of Available Data From in Vitro Studies and Experimental Model en Rodents. *Experimental Physiology*. 93.5 pp. 557 – 563.
- Danser, J. and Deinum, J. (2005). Renin, Prorenin and Putative (Pro)renin Receptor. *Hypertension and Journal of the American Heart Association*. 46. pp 1069 – 1076
- Susuki, F. (2007). Non proteolytic activation of prorenin by the (pro) renin receptor is blocked by decoy peptide. *Renin Report, Spotlight on Renin*. Issue 7. pp 101 – 103
- Lopez, S. P., Reyes, M P.A., Anguiano, R. L., Bobadilla, L. R. A. (2006). Sub renal Aortic Coarctation: Caracterización as a Pregnancy – Induced Hipertensión Model in the Rat. *Proc. West. Pharmacol. Soc*. 49. pp 40 – 41.

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA

- Anguiano, R. L., Reyes, M P.A., Bobadilla, L. R. A., Perez, A. V. M. and Lopez, S. P. (2007). Renal Angiotensin – II Receptors Expresión Changes in a Model of Preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy.* 26. pp 151 – 161
- Bobadilla, L. R. A., Valencia, H. I., Pérez, A. V. M., Mera, J. E., and Castillo, H. C. (2001). Changes in Vascular Reactivity Following Subrenal Aortic Constriction in Pregnant and Nonpregnant Rats. *Hypertension in Pregnancy.* 20 (2). pp 143 – 156
- Schwarcz, R. Fescina, (2005). Cap. 4: Modificaciones de la Anatomía y Fisiología Materna Producidas por el Embarazo. En *Obstetricia.* Ed. El Ateneo, Argentina. 6ª Edición. pp. 51-75
- Atsuhiko Ichihara, Yuki Kaneshiro, Tomoko Takemitsu, Mariyo Sakoda, Fumiaki Suzuki, Tsutomu Nakagawa, Akira Nishiyama, Tadashi Inagami, Matsuhiko Hayashi Nonproteolytic Activation of Prorenin Contributes to Development of Cardiac Fibrosis in Genetic Hypertension *Hypertension.* 2006; 47:894-900.
- ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee on Obstetric Practice. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002 Apr;77(1):67-75.
- Rush JW, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Feb;33(1):162-72
- Robson A. S. Santos, Anderson J. Ferreira and Ana Cristina Simões e Silva Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2 angiotensin(1 7) Mas axis, *Exp Physiol* 2008;93;519-527; originally published online Feb 29, 2008;

- Ben-Ari J, Meggs LG, Stitzel R, Chander P, Gammon D, Goodman AI, Head R. Upregulation of the vascular alpha-1 receptor in malignant DOCA-salt hypertension. Clin Exp Hypertens A. 1988;10(2):229-47.
- Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. J Clin Invest. 1986 Jul;78(1):31-9.
- Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS, Bernstein EA. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. J Biol Chem. 1989 Jul 15;264(20):11945-51.
- Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Dec; 85(24):9386-90.
- Naftilan AJ. Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1994 Mar;3(2):218-27.
- Genevieve Nguyen, Françoise Delarue, Céline Burcklé, Latifa Bouzahir, Thomas Giller. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to rennin. J. Clin. Invest. 109:1417–1427, 2002.
- Podjarny, Eduardo, Losonczy Gyorgy, Baylis Chris. Animal Models Of Preclampsia. Semin Nephrol 24:596 – 606, 2004.
- Huppertz Berthold. Placental origins of preclampsia, challenging the current hypothesis. Hypertension. 51:970 – 975, 2008.

- Jeffrey S. Gilbert, Michael J. Ryan, Babbette B. LaMarca, Mona Sedeek, Sydney R. Murphy and Joey P. Granger. pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H541 – H550, 2008.
- Jhon M. Davison, Volker Homuth, Arun Jeyabalan, Kirk P. Conrad, Ananth Karumanchi, Susan Quaggin, Ralf Dechend, Friedrich C. Luft. New aspect in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 15: 2440 -2448, 2004
- Sakoda Marinyo, Ichiara Atsihuro, Yuki Kaneshiro, Tomoko Takemitsu, Yuichi Suzuki, Tadashi Inigami, Hiroshi Itho. (pro)rennin receptor - mediated activation of mitogen – activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*, 30: 1139 – 1146; 2007
- Atsuhiro Ichihara, Yuki Kaneshiro, Tomoko Takemitsu, Sakoda Marinyo, Sakoda Marinyo, Tsutomu Nakagawa, Akira Nishiyama, Tadashi Inigami, Matsuhiko Hayashi. NONPROTEOLYTIC ACTIVATION OF PRORENIN CONTRIBUTES TO DEVELOPMENT OF CARDIAC FIBROSIS IN GENETIC HYPERTENSION. *Hypertension*; may 2006, 47; 894 – 900.
- Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, Kvakon H, Deched R, Fiebeler A, Danser AHJ, Bender M, Nguyen G. Prorenin and rennin-induced extracellular signal-regulated kinases 1/2 activation in monocytes its not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. *Hypertension* 2008; 51: 682-688
- Brown, N.J., and Vaughan. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv. Intern. Med.* D.E. 2000; 45:419–429.

- Maru, I., Ohta, Y., Murata, K., and Tsukada, Y. Molecular cloning and identification of N-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney as renin-binding protein. *J. Biol. Chem.* . 1996; 271:16294–16299.
- Poisner AM. Regulation of utero-placental prorenin. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 377:411-26.
- Krebs C, Hamming I, Sadaghiani S, Steinmetz OM, Meyer-Schwesinger C, Fehr S, Stahl RA, Garrelds IM, Danser AH, van Goor H, Contrepas A, Nguyen G, Wenzel U. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney Int. Sep 2007; 72(6):725-730.*
- Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J. Renin increases mesangial cell transforming growth factor –b1 and matrix proteins through receptor – mediated angiotensina II independient mechanisms. *Kidney int 2006; 69: 105 _ 113*
- Ichihara A. Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y et. Al: Pro rennin receptor blockade inhibits development of glomeruloesclerosis in diabetic angiotensina II type 1a receptor deficient mice. *J Am Soc Nephrol 2006;17: 1950 -1961*
- Kenichiro Kinouchi, Atzuhiko Ichihara, Motoki Sano, et. al. The (pro) renin receptor /ATP6AP2 is essential for vacuolar H+ - ATPase Assembly in Murine Cardiomyocytes. *Circulation Research 107 (1); 2010; 30 – 34.*
- <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/1035/1/Enfermedad-hipertensiva-del-embarazo.-Hipertension-en-la-gestante> (30/07/10: 17:45 hrs)

- Crews JK, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Decreased endothelium – dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. Hypertension. 2000; 35: 367 – 375.
- Orshal JK, Khalil RA, reduced endothelial NO – cGMP – mediated vascular relaxation an hypertension in IL – 6 –infused pregnant rats. Hypertension. 2004; 43 434 – 444.
- Nori M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porrati F, Benigni A, Piccolo C, Remuzzi G. Larinine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. Hypertension. 2004; 43: 614 -622.
- McCord N, Ayuk P, McMahoan M, Boyd RCA, Sargent I, Redman C. System y+ arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia. Hypertension 2006; 47: 109 – 115.
- Speer PD, RW Powers, MP Frank, G Harger, N Markovic, Roberts JM. Elevated asymmetric dimethylarginine concentration precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small – for – gestational – age infants. Am J Obstet Gynecol. 2008; 198: 112 e 1 – 7.
- Rajimakers MTM, Deched R, PostonL. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. Hypertension 2004; 44: 374 – 380.
- Baker H., Lindsey R., Wersbroth S.; Sheldon Bivin. M. Crafwford N. R. Brew. The laboratory Rat Vol. I biology and disease. American college of laboratory animal medicine series. Ed academic press inc. 1983; 86 -88.

- Takahashi K, Hiraishi K, Hirose T, Kato I, Yamamoto H, Shoji I, Shibasaki A, Kaneko K, Satoh F, Totsune K. Expression of (pro)renin receptor in the human brain and pituitary, and co-localisation with arginine vasopressin and oxytocin in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2010 May;22(5):453-9. Epub 2010 Feb 12.

- Aurelie Contrepas,^{1,*} Joy Walker,^{2,*} Annette Koulakoff,³ Karl J. Franek,² Fatimunnisa Qadri,⁴ Christian Giaume,³ Pierre Corvol,¹ Charles E. Schwartz,^{2,†} and Genevieve Nguyen^{1,†} A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell differentiation *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R250-R257, 2009. First published May 27, 2009; doi:10.1152/ajpregu.90832.2008 0363-6119/09.

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)

- Inaba S, Iwai M, Horiuchi M. Role of RAS in prehypertension. *Nippon Rinsho.* 2008 Aug;66(8):1503-8.

- Takaaki Senbonmatsu¹, Shinichi Irida, Yoshimi Aizaki, Shigeyuki Nishimura², Tadashi Nagami. New perspectives on secretion of (pro)renin receptor in to extracellular space. *Frontiers in Bioscience* E2, 1362-1367, June 2010

- Anton L, Brosnihan KB. Systemic and uteroplacental renin-angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Thromb Haemostasis.* 2008 Oct;2(5):349-62.

- The MEROPS database as a protease information system.

- Holly A. Shiels^{1,*} and Ed White² The Frank–Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes The Journal of Experimental Biology The Company of Biologists 2008; 211, 2005-2013.
- Stöhr EJ, González-Alonso J, Pearson J, Low DA, Ali L, Barker H, Shave R. Effects of graded heat stress on global left ventricular function and twist mechanics at rest and during exercise in healthy humans. Exp Physiol. 2010 Oct 15.
- Guyton, Hall. Tratado de fisiología medica, capitulo 9, musculo cardiaco, ed. McGraw Hill decima edición 2001, pp 115 – 127.
- Shokei Kim, Hiroshi Iwao. MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF ANGIOTENSIN II – MEDIATED CARDIOVASCULAR AND RENAL DISEASES. American society for pharmacology and experimental therapeutics 2001. pp 11-33.
- Dostal DE and Baker KM. ANGIOTENSIN II STIMULATION OF LEFT BENTRICULAR HYPERTROPHY IN ADULT RAT HEART: MEDIATION BY THE AT1 RECEPTOR. Am J hypertens 5; 1992 276 -280.
- Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS and Weber KT. CARDIAC MYOCYTE NECROSIS INDUCED BY ANGIOTENSIN II. Circ res 1991, 1185 – 1195.
- Kim S, Ohta K, Hamaguchi A. Yukimura T, Miura K, and Iwao H. ANGIOTENSIN II INDUCES CARDIAC PHENOTYPIC MODULATION AND REMODELING IN VIVO IN RATS. Hypertension 1995; 25; 1252 – 1259.
- Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonbentre JV and Kyriakis JM. STRESS – ACTIVATED PROTEIN KINASES IN CARDIOVASCULAR DISEASE. Circ res. 78; 1996; 947 -953.

- Sugden PH and Clerk A. “STRESS – RESPONSIVE” MITOGEN – ACTIVATED POTEIN KINASES (c –JUN N –terminal kinases and P38 mitogen – activated protein kinases) IN THE MYOCARDIUM. *Circ. Res.* 83; 1998; 345 – 352.
- Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han j and Chien KR. CARDIAC HYPERTROPHY INDUCED BY MITOGEN - ACTIVATED PROTEIN KINASE 7, A SPECIFIC ACTIVATOR FOR c JUN NH -2 TERMINAL KINASE IN VENTRICULAR MUSCLE CELLS.. *J Biol Chem* 273; 1998; 5423 – 6426
- Tamargo J. Recuerdo fisiológico del sistema reninaangiotensina-aldosterona. *Medicine.* 1996;21:829-35.
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local reninangiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006; 86:747- 803.
- Dzau V. The cardiovascular continuum and renin-angiotensinaldosterone system blockade. *J Hypertens Suppl.* 2005;23:S9-17.
- Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium diverse signals and effects. *Hypertension.* 2005;45: 163-9
- Sielecki AR, Hakayawa K, Fujinaga M, Murphy ME, Fraser M, Muir AK, et al. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 A resolution. *Science.* 1989;243:1346-51.[\[Medline\]](#)
- Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension.* 2005; 46:1069-76.
- Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rüeger H, Göschke R, Cohen NC, et al. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chem Biol.* 2000;7:493-504.

• *Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest. 2002;109:1417-27

• *Hsueh WA, Baxter JD.* Human prorenin. Hypertension. 1991;17:469-79.

• *Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A.* Raised prorenin and renin concentrations in pre-eclamptic placentae when measured after acid activation. Placenta. 2004;25:631-3.

• *Danser AH, Van Kesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, et al.* Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. Circulation. 1997;96:220-6.

• *Saris JJ, 'tHoen PAC, Garrelds IM, Dekkers DHW, Den Dunnen JT, Lamers JMJ, et al.* Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. Hypertension. 2006;48:564-71

• *Campbell DJ.* Critical review of prorenin and (Pro)renin receptor research. Hypertension. 2008;51:1-2

- *Neves FA, Duncan KG, Baxter JD.* Cathepsin B is a prorenin processing of human prorenin enzyme. Hypertension. 1996;27:514-7. [Medline]
- *Saris JJ, Derkx FH, De Bruin RJ, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, et al.* High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. Am J Physiol. 2001;280:H1706-15.
- *Derkx FHM, Deinum J, Lipovski M, Verhaar M, Fischli W, Schalekamp MADH.* Nonproteolytic activation of prorenin by active site-directed renin inhibitors as demonstrated by renin-specific monoclonal antibody. J Biol Chem. 1992;267:22837-42.
- *Zhao C, Vaidyanathan S, Yeh CM, Maboudian M, Armin Dieterich H.* Aliskiren exhibits similar pharmacokinetics in healthy volunteers and patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Pharmacokinet. 2006;45:1125-34.
- *Danser AHJ, Batenburg WW, Van Esch HM.* Prorenin and the (pro)renin receptor-an update. Nephrol Dial Transplant. 2007;22:1288-92.
- *Nabi AH, Kageshima A, Uddin MN, Nakagawa T, Park EY, Suzuki F.* Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system. Int J Mol Med. 2006;18:483- 8.
- *Nguyen G.* Renin/prorenin receptors. Kidney Int. 2006;69:1503-6.
- *Scheffe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, et al.* A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. Circ Res. 2006;99:1355-66.

- *Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, Mullins JJ.*

Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. J Clin Invest. 1996;98:1966-70.

- *Burckle C, Danser AHJ, Müller DN, Garrelds IM, Gasc J-M, Plehm R, et al.*

Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. Hypertension. 2006;47:552-6.

• *Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al.* Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. Kidney Int. 2006;69:105-13.

• *Huang Y, Noble NA, Zhang J, Xu C, Border WA.* Renin-stimulated TGF- β 1 expression is regulated by a mitogenactivated protein kinase in mesangial cells. Kidney Int. 2007;72:45-52.

• *Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD.* Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. Kidney Int. 1996;50:1897-903.

• *Yokota H, Mori F, Kai K, Nagaoka T, Izumi N, Takahashi A, et al.* Serum prorenin levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes: new method to measure serum level of prorenin using antibody activating direct kinetic assay. Br J Ophthalmol. 2005;89:871-3.

• *Burckle C, Bader M.* Prorenin and its ancient receptor. Hypertension. 2006;48:549-51.

- *Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N.*

Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:12792-7.

- Villaverde Fernandez S, Rodríguez melcon A, Villaverde Baron S

Modificaciones de la sangre en el embarazo. Cambios circulatorios y respiratorios.

En Cabrero Roura L, Cabrilla Rodríguez E, Abad L, et. al., Editores. Tratado de ginecología obstetricia y medicina de la reproducción. Tomo 1. Madrid: editorial medica panamericana; 2003. Pp. 238 – 248.

- Whittaker PG, McPhail S, Lind T. serial hematologic Changes and pregnancy outcome. Obstet gynecol 1996; 88: 33- 39.