



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

*“INFLUENCIA DEL EMBARAZO SOBRE LOS RECEPTORES
A ANGIOTENSINA II (AT1-AT2) EN ANILLOS
DE AORTA DE RATA”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD FARMACOLOGÍA
P R E S E N T A :
VERÓNICA ORTIZ ZÚÑIGA



ÍNDICE GENERAL

Índice general	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xii

I. Antecedentes	1
1.1 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)	1
1.1.1 Antecedentes históricos	1
1.1.2 Componentes del SRA	2
1.1.2.1 Angiotensinógeno	4
1.1.2.2 Renina	5
1.1.2.3 Enzima Convertidora de Angiotensina	8
1.1.2.4 Angiotensina II	8
1.1.3 Metabolitos de Ang II	10
1.1.3.1 Ang III (2-8)	10
1.1.3.2 Ang IV (3-8)	11
1.1.3.3 Ang (1-7)	11
1.2 Receptores de angiotensina	12
1.2.1 Generalidades	12
1.2.2 Receptor AT ₁	13
1.2.2.1 Distribución y función	13
1.2.2.2 Características estructurales	14
1.2.2.3 Propiedades farmacológicas	14
1.2.2.4 Mecanismos transduccionales	15
1.2.3. Receptor AT ₂	17

1.2.3.1 Distribución y función	17
1.2.3.2 Mecanismos transduccionales	19
1.3 Cambios Cardiovasculares Asociados al Embarazo	20
1.3.1 Mediadores endoteliales en los cambios vasculares durante el embarazo	22
1.3.2 La síntesis de prostaglandinas en el embarazo	23
1.3.3 Sistema Renina Angiotensina y embarazo	24
2. Planteamiento del problema	28
3. Hipótesis	29
4. Objetivo General	30
5. Objetivos Particulares	30
6. Métodos	31
7. Protocolo experimental	32
7.1 Análisis de la expresión proteica de los receptores a Ang II y de las isoformas de la COX y SONE en aorta torácica y abdominal de rata	32
7.2 Elaboración de geles de poliacrilamida.....	33
7.3 Soluciones utilizadas	38
7.4 Inmunoprecipitación para la determinación del heterodímero AT1/AT2 en la porción abdominal y torácica de la aorta de rata	40
7.5 Estudio de la reactividad vascular en anillos de aorta aislados in vitro.....	41
8. Fármacos utilizados	43
9. Análisis de los datos	44
10. Resultados	45
10.1 Determinación de la reactividad vascular a Ang II en anillos aorta torácica y abdominal de ratas NE y embarazadas	45

10.2	Expresión proteica del receptor AT ₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas	47
10.3	Determinación de la expresión proteica del receptor AT ₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE)	48
10.4	Determinación de la expresión proteica del receptor AT ₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas Embarazadas	49
10.5	Expresión proteica del receptor AT ₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas	51
10.6	Determinación de la expresión proteica del receptor AT ₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE)	52
10.7	Determinación de la expresión proteica del receptor AT ₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	53
10.8	Evaluación de la participación del ON en la reactividad vascular a Ang II en anillos de aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE	55
10.9	Expresión proteica de la isoenzima NOSe en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas	59
10.10	Determinación de la expresión proteica de la SONE en aorta torácica y abdominal de ratas NE	60
10.11	Determinación de la expresión proteica de la SONE en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	61
10.12	Evaluación de la participación de las prostaglandinas en la reactividad vascular a Ang II en anillos de aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE	63
10.13	Expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta torácica abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas	67
10.14	Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX1 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE)	68
10.15	Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX1 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	69
10.16	Expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas	71
10.17	Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX2 en aorta torácica y abdominal de ratas NE	72
10.18	Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX2 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	73
10.19	Determinación de la expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica y abdominal de ratas NE y Embarazadas	75
10.20	Determinación de la expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica y abdominal de ratas NE	76
10.21	Determinación de la expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	77

11. Discusión	79
12. Conclusiones	86
13. Referencias Bibliográficas	87

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Producción de Ang II y péptidos relacionados	3
2. Mecanismos involucrados en la liberación de renina y formación de Ang II.....	6
3. Estructura de los antagonistas no peptídicos de los receptores AT ₁ y AT ₂	16
4. Eventos de señalización en un curso temporal mediados por la Ang II en células de músculo liso vascular	18
5. Curvas concentración-respuesta a Ang II en anillos íntegros de aorta del segmento torácico y abdominal de ratas NE y embarazadas.....	45
6. Expresión proteica del receptor AT ₁ en aorta torácica	47
7. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica	47
8. Expresión proteica del receptor AT ₁ en aorta abdominal	47
9. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal	47
10. Expresión proteica del receptor AT ₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas.....	48
11. Expresión proteica del receptor AT ₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas.....	49
12. Expresión proteica del receptor AT ₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE.....	50
13. Expresión proteica del receptor AT ₂ en aorta torácica.....	51
14. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica.....	51
15. Expresión proteica del receptor AT ₂ en aorta abdominal	51
16. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal	51
17. Expresión proteica del receptor AT ₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas.....	52
18. Expresión proteica del receptor AT ₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas.....	53
19. Expresión proteica del receptor AT ₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE.....	54

20. Efecto de la inhibición de ON con L-NAME [10 ⁻⁴ M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta torácica de ratas NE y embarazadas.....	56
21. Efecto de la inhibición de ON con L-NAME [10 ⁻⁴ M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta abdominal de ratas NE y embarazadas.....	57
22. Expresión proteica de la enzima NOSe en aorta torácica	59
23. Expresión proteica de β-actina en aorta torácica.....	59
24. Expresión proteica de la enzima NOSe en aorta abdominal.....	59
25. Expresión proteica de β-actina en aorta abdominal	59
26. Expresión proteica de la SONE en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas.....	60
27. Expresión proteica de la isoenzima SONE en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	61
28. Expresión proteica de la enzima SONE en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE.....	62
29. Efecto de la inhibición de prostaglandinas con indometacina [10 ⁻⁵ M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta torácica de ratas NE y embarazadas.....	64
30. Efecto de la inhibición de prostaglandinas con indometacina [10 ⁻⁵ M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta abdominal de ratas NE y embarazadas.....	65
31. Expresión proteica de la enzima COX-1 en aorta torácica	67
32. Expresión proteica de β-actina en aorta torácica.....	67
33. Expresión proteica de la enzima COX-1 en aorta abdominal.....	67
34. Expresión proteica de β-actina en aorta abdominal	67
35. Expresión proteica de la COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas	68
36. Expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas	69
37. Expresión proteica de la COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE.....	70

38. Expresión proteica de la enzima COX-2 en aorta torácica.....	71
39. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica.....	71
40. Expresión proteica de la enzima COX-2 en aorta abdominal.....	71
41. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal.....	71
42. Expresión proteica de la COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas.....	72
43. Expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta torácica y Abdominal de ratas embarazadas.....	73
44. Expresión proteica de la COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas embarzadas y NE.....	74
45. Expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica.....	75
46. Expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta abdominal.....	75
47. Expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas.....	76
48. Expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas.....	77
49. Expresión proteica del heterodímero AT ₁ /AT ₂ en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

1. Valores de Emax y afinidad (pD_2) en la respuesta contráctil a Ang II en el segmento torácico y abdominal de anillos de aorta de ratas NE y Embarazadas.....	40
2. Valores de Emax y afinidad (pD_2) en la respuesta contráctil a Ang II en el segmento torácico y abdominal de anillos de aorta de ratas NE y Embarazadas en presencia y ausencia de L-NAME [$10^{-4}M$]	43
3. Valores de Emax y afinidad (pD_2) en la respuesta contráctil a Ang II en el segmento torácico y abdominal de anillos de aorta de ratas NE y Embarazadas en presencia y ausencia de Indometacina [$10^{-5}M$]	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenil monofosfato cíclico
AA	Ácido Araquidónico
Ach	Acetilcolina
Ang II	Angiotensina II
AT ₁	Receptor de Angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor de Angiotensina II tipo 2
ATP	Adenosina Trifosfato
B ₂	Receptor a bradicinina tipo 2
BK	Bradicinina
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CMLV	Células del Músculo liso vascular
COX	Ciclooxigenasa
DAG	Diacilglicerol
DST	Disuccinimidil Tartrato
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
EGF	Factor de crecimiento epidermal
E _{max}	Efecto máximo
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GMPc	Guanilil Monofosfato cíclico
IAA	Iodoacetamida
IP ₃	4,5,6 trifosfato de Inositol
L-NAME	N ω -L-nitroarginina metil éster
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MLV	Músculo liso vascular
ON	Óxido Nítrico
pD ₂	-Log (CE ₅₀)
PG	Prostaglandina

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PKC	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PVDF	Polyvinilidene Difluoride
SON	Sintasa de Óxido Nítrico
SONe	Sintasa de Óxido Nítrico endotelial
SRA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TLCK	Nαp-Tosyl-Lysine Chloro methyl Ketona
TXA ₂	Tromboxano A ₂
COX-2	Ciclooxigenasa-2
COX-1	Ciclooxigenasa-1
MKP-1	Fosfatasa de la proteína cinasa activada por mitógeno
5HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
20 HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la contractilidad arterial mediada por Ang II, de la aorta en sus dos segmentos, tanto torácico como abdominal, también se estudió el papel que juegan los mediadores endoteliales como el ON en el caso de la inhibición de la SONE con L-NAME ($10^{-4}M$) y los productos derivados de la ciclooxigenasa en el caso de la inhibición con Indometacina ($10^{-6}M$); para esto se utilizó la preparación de órgano aislado donde se montaron anillos de aorta torácica y abdominal de ratas No Embarazadas (NE) y Embarazadas en la tercera semana de gestación. Se evaluó también, la expresión proteica de los receptores a Ang II (AT_1 y AT_2) así como de las isoenzimas COX-1, COX-2 y SONE en el mismo grupo de animales mediante la técnica de inmunoblot. Por último, se determinó, mediante la técnica de inmunoprecipitación, la formación de un heterodímero entre los receptores AT_1/AT_2 en la aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE.

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia de que la respuesta contráctil a Ang II se encuentra disminuida durante el embarazo, y que la densidad de receptores AT_1 no se modifica durante el mismo, sin embargo la de los receptores AT_2 aumenta, por otro lado, también muestran que existen diferencias regionales en la expresión de ambos receptores a lo largo de la aorta, encontrándose una mayor expresión de los mismos en el segmento torácico en comparación con el abdominal tanto en animales no embarazados como embarazados; además se encontró que el óxido nítrico parece no jugar un papel muy importante en la modulación de la respuesta contráctil a Ang II a pesar de que se demostró un aumento de la SONE durante el embarazo en el segmento abdominal de la aorta; por otro lado, en la modulación de la vasoconstricción inducida por Ang II al parecer participa una prostaglandina contráctil, pues la inhibición de la COX, produjo una disminución de la respuesta a Ang II y esto fue más evidente en el segmento abdominal, mientras que también se demostró

que ambas isoformas de la COX aumentaron su expresión proteica durante el embarazo en este segmento de la aorta.

Por último se demostró la formación del heterodímero AT₁/AT₂ en la aorta en sus dos segmentos y que esta heterodimerización aumenta durante el embarazo en el segmento abdominal, lo que sugiere que la atenuación de la respuesta contráctil a Ang II esta dada por la formación de este heterodímero durante el embarazo.

ABSTRACT

In the present work, we studied the contractility of the aortic thoracic and abdominal segments mediated by Ang II. We also studied the role of endothelial mediators as Nitric Oxide by inhibiting the eNOS with L-NAME (10^{-4} M), and the products derived from cyclooxygenase by inhibiting the enzyme with Indomethacin (10^{-6} M). We used an isolated organ preparation where rings from rat thoracic and abdominal aortas from pregnant and non-pregnant rats at the end of the third week of gestation were mounted. We also evaluated the protein expression of Ang II receptors (AT1y AT2), COX-1, COX-2 and eNOS isoenzymes in groups of pregnant and non-pregnant animals using immunoblot. Finally, using an immunoprecipitation technique, we determined AT1/AT2 receptors heterodimerization in the thoracic and abdominal aorta from non-pregnant and pregnant rats.

The results obtained show that the contractile response to Ang II is diminished at the end of pregnancy, and the expression of AT1 receptors is not modified in the pregnant rats. The expression of AT2 receptors however, is increased. We also found that there is a differential, regional expression of both receptors along the aorta, being the expression higher in the thoracic segment in comparison with the abdominal segment in both not-pregnant and pregnant rats; besides, we found that nitric oxide seems not to play an important role in the modulation of the contractile response to Ang II, despite of this, we showed in this work an increased expression of eNOS during pregnancy in the abdominal segment of the aorta. Interestingly, in the vasoconstrictor response elicited by Ang II, a contractile prostaglandin probably participates, given that the inhibition of the COX isozymes by indomethacin decreased the contractile response to Ang II and this effect was more evident in the abdominal segment. By immunoblot, protein expression of both isoforms of COX increased at the end of the pregnancy in this aorta segment. Finally, AT1/AT2 heterodimerization was shown in both aortic segments. In abdominal segment from pregnant animals, heterodimerization was higher than

thoracic segment, suggesting that the blunted response to Ang II could be explained in part, by formation of this heterodimere during pregnancy.

1. ANTECEDENTES

1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

1.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Stephen Hales en 1937 midió la presión sanguínea por primera vez en la arteria carótida de un caballo, pero fue hasta 1905 cuando Nicolai Korotkov usó el estetoscopio inventado por Laennec en 1815 para medir la presión estableciendo la técnica de medición de la presión que se utiliza hasta la fecha.

En 1897, Tigerstedt y Bergman descubrieron una sustancia presora en los extractos renales de conejo a la que denominaron renina. En 1934, Goldblatt y col. demostraron que el pinzamiento de las arterias renales de perros producía hipertensión. Años más tarde, en 1940, Braun Menéndez y col., en Argentina y Page con su equipo de colaboradores en Estados Unidos descubrieron que la renina era una enzima que actuaba sobre una proteína plasmática (angiotensinógeno) catalizando la formación de una sustancia presora a la que el primer grupo denominó *hipertensina* y el segundo *angiotonina*. En 1958 Braun Menéndez y Page decidieron acuñar el nombre híbrido ***Angiotensina*** a éste potente vasopresor.

En la década de los 50's se descubrieron dos formas de angiotensina, la angiotensina I con 10 aminoácidos y la angiotensina II con 8 aminoácidos, ésta última formada a partir de la primera por medio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Skeggs y col., 1956; Bumpus y col., 1957; Elliott and Peart, 1957).

La síntesis de angiotensina II (Ang II) permitió el desarrollo de grandes avances en la investigación de la misma, hecho realizado por Schwyzer y Bumpus en 1957. Fue hasta 1968 cuando Gross sugirió que el sistema renina angiotensina participaba en la regulación de la secreción de aldosterona, ya que él observó que cuando la angiotensina era administrada en pequeños volúmenes en humanos se estimulaba la producción de aldosterona. Por otro lado observó que la depleción experimental de sodio producía un incremento en la secreción de renina.

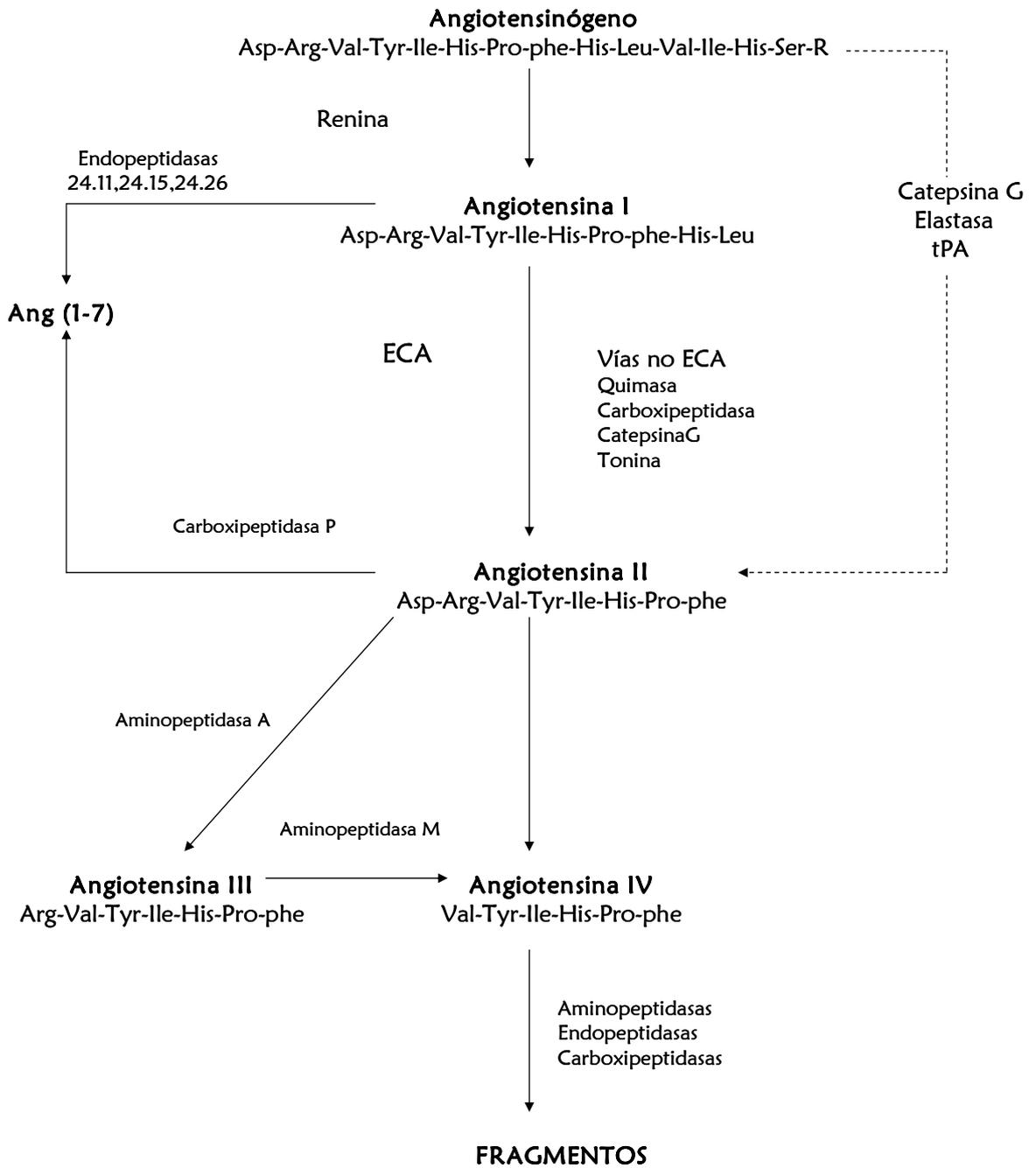
El conocimiento de estos hallazgos ha permitido conocer la importancia de este sistema en la regulación homeostática de la presión arterial y la composición de electrolitos de los líquidos corporales (Goldblatt et al., 1934; Gross, 1968; Skeggs y col., 1976).

1.1.2 COMPONENTES DEL SRA

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales que desempeña un papel integral en la homeostasis cardiovascular al influir en el tono vascular, el balance hidroelectrolítico y en el sistema nervioso simpático. Las acciones biológicas de este sistema son mediadas principalmente por el octapéptido altamente activo, la angiotensina II (Dinh y col., 2001).

El SRA es considerado un sistema endocrino en el cual la renina liberada de las células yuxtaglomerulares del riñón degrada al *angiotensinógeno* una macroglobulina producida por el hígado para generar el decapeptido inactivo, la *angiotensina I*, la cual es convertida al octapéptido activo *angiotensina II* por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) dentro de la circulación pulmonar.

Además del SRA sistémico la Ang II se genera localmente en distintos tejidos incluyendo el corazón, riñón, glándulas suprarrenales, cerebro y vasculatura, influyendo en la función de estos órganos debido a que se perfunden continuamente (Campell, 1987; Danser, 1996; Stroth and Unger, 1999).



tPA: Activador del Plasminógeno tisular

Figura 1. Producción de Ang II y péptidos relacionados

En los tejidos, la Ang II puede provenir del angiotensinógeno a través de la cascada enzimática renina-ECA, y puede originarse a partir de angiotensina I por medio de otras enzimas como la quimasa, la cual se encuentra de manera

abundante en corazón, vasos sanguíneos y otros órganos. También la Ang II se puede formar directamente del angiotensinógeno a través de la catepsina G y la elastasa, las cuales son liberadas de los neutrófilos en sitios cercanos a la inflamación o alrededor de los vasos sanguíneos, y por último puede formarse por el activador del plasminógeno tisular (Siragy and Carey 1999). Los efectos de Ang II en los diferentes órganos blanco son mediados por receptores específicos de membrana, los receptores AT₁ y AT₂.

El SRA esta constituido por:

- 1) *Angiotensinógeno*, una gran proteína globular que sirve como sustrato para la
- 2) *Renina*, enzima que cataliza la conversión proteolítica de angiotensinógeno al decapeptido angiotensina I;
- 3) *Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)*, una dipeptidil carboxipeptidasa que convierte a la angiotensina I al octapéptido Ang II;
- 4) *Angiotensina II*
- 5) *Receptores de Ang II; AT₁ y AT₂*, responsables de los efectos celulares producidos por la Ang II.

1.1.2.1 Angiotensinógeno

El angiotensinógeno es el mayor sustrato para la renina y el precursor de la Ang II. A partir de su porción aminoterminal se desdobra la Angiotensina I. Estructuralmente es una glucoproteína globular con un peso molecular de 55-65 kDa y un pI de 4.3-4.9, dependiendo del grado de glucosilación (Clauser y col., 1989).

El gen del angiotensinógeno mide 13 Kb, se encuentra en el cromosoma 1q42-43 y comprende cinco exones y cuatro intrones. (Clauser y col., 1989). La estimulación para la producción de angiotensinógeno ocurre en horas o días en respuesta a efectos de estimulación de angiotensina II, estrógenos, hormonas tiroideas, y glucocorticoides en elementos regulativos en el gen promotor. De

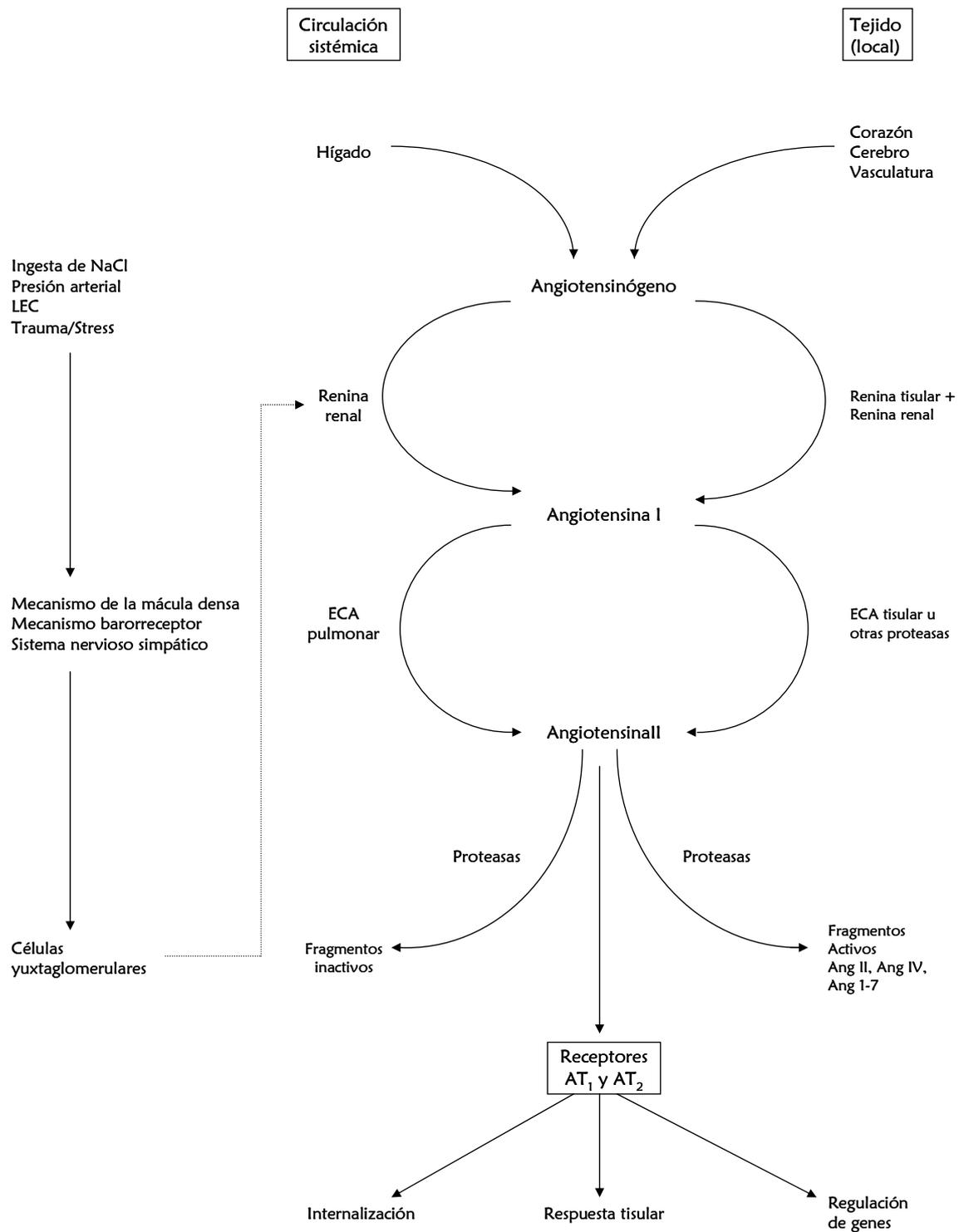
manera paradójica, la angiotensina II muestra una regulación positiva en la producción de angiotensinógeno al ejercer una influencia de retroalimentación negativa sobre la renina (Menard J, y col; 1993).

El principal lugar donde se produce el angiotensinógeno es el hígado, en la rata se encontró la expresión RNAm también en cerebro, medula espinal, aorta (adventicia y músculo liso) y arteria mesentérica. (Campbell DJ; y col., 1986)

1.1.2.2 Renina

La renina es una enzima glucoproteolítica responsable del primer paso en la formación de Ang II. La purificación y clonación de renina humana, de ratón y de ratas ha permitido esclarecer su estructura y función. La renina constituye una cadena sencilla de aspartil proteasa con un peso molecular de 37-40 kDa y un pI de 5.2-5.8. En contraste con otras proteasas, la renina es altamente específica para el angiotensinógeno y posee mayor actividad a pH neutro. Esta enzima separa el enlace entre los residuos 10 y 11 en la porción aminoterminal de esta proteína para generar angiotensina I (Dzau y col., 1988).

La renina es sintetizada como una preproenzima de 406 residuos de aminoácidos que se convierten a prorenina, una forma madura pero inactiva de la proteína, ésta es activada por una enzima que elimina 43 aminoácidos de la porción aminoterminal, obteniéndose de esta manera la forma activa de la renina, que contiene 340 aminoácidos. Tanto la prorenina como la renina se sintetizan y almacenan en las células yuxtglomerulares de las arteriolas aferentes del riñón y son liberadas a la circulación sanguínea (Figura 2). El volumen de renina liberada por los riñones es el principal determinante de la tasa de producción de Ang II. Además la concentración de renina en el torrente sanguíneo es 10 veces menor que la prorenina y la vida media de la renina circulante es de 15 minutos aproximadamente (Dzau y col., 1988).



Modificado de Timmermans y col., 1993

Figura 2. Mecanismos involucrados en la liberación de renina y formación de Ang II.

La expresión de RNAm de la renina parece ser regulada diferencialmente, así, la depleción de sodio o la activación del receptor β -adrenérgico incrementa la expresión de renina en el riñón, corazón y en las glándulas suprarrenales, pero no en los órganos reproductores ni en las glándulas parótidas. Sin embargo, en estos dos últimos tejidos, el RNAm de la renina es regulado por los andrógenos (Dzau y col., 1986). La expresión de renina renal también es regulada por alteraciones en los niveles de Ang II. En este contexto, se ha observado que el tratamiento con enalapril incrementa la expresión del RNAm de renina renal en ratas y la infusión de Ang II la revierte (Johns y col., 1990).

La secreción de renina a partir de las células yuxtaglomerulares está controlada de manera importante por tres mecanismos, dos a nivel local, la vía de la mácula densa y el barorreceptor intrarenal, y por el receptor β -adrenérgico a nivel central, aunque también pueden influir en su secreción factores humorales, como la misma Ang II (Figura 2).

Mácula densa

La mácula densa se compone de células epiteliales cilíndricas especializadas que se localizan en la pared de la rama ascendente gruesa cortical que pasa entre las arteriolas aferente y eferente del glomérulo y está adyacente a las células yuxtaglomerulares. Cualquier cambio en la reabsorción de sodio por la mácula densa origina la transmisión de señales químicas hacia las células yuxtaglomerulares cercanas, que modifican la secreción de renina, por lo que incrementos en el flujo de NaCl a través de la mácula densa inhiben la liberación de renina y las disminuciones, la estimulan (Dzau y col., 1986).

Barorreceptor intrarenal

Cuando la presión arterial en los vasos preglomerulares aumenta o disminuye, la liberación de renina se inhibe o se estimula, respectivamente. Al

parecer el estímulo inmediato para su secreción consiste en la disminución de la tensión dentro de la pared de la arteriola aferente. Por otra parte, los incrementos y decrementos de la presión de perfusión pueden inhibir y estimular, respectivamente, la liberación de prostaglandinas renales, lo que puede mediar en parte la vía del baroreceptor intrarrenal (Griendling y col., 1993).

Receptor β -adrenérgico

El tercer mecanismo está mediado por la liberación de noradrenalina a partir de las terminales nerviosas simpáticas postganglionares. Cuando se activan los receptores β_1 -adrenérgicos sobre las células yuxtglomulares se incrementa la secreción de renina (Griendling y col., 1993).

1.1.2.3 Enzima Convertidora de Angiotensina

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es un miembro de la familia de las metalopeptidasas de zinc y contiene un equivalente molar de que le permite llevar a cabo su función catalítica. Consiste en una cadena sencilla que es moderadamente hidrofóbica y se encuentra predominantemente unida a membrana en la porción carboxilo terminal. A pesar de que su secuencia señala la presencia de dos sitios activos, al parecer sólo uno de ellos es funcional (Bünning y col., 1983).

1.1.2.4 Angiotensina II

La mayoría de las funciones fisiológicas y efectos patológicos mediados por Ang II son producidos principalmente por los receptores AT_1 , los cuales están presentes en diversos tejidos. Sin embargo se ha demostrado que por medio del receptor AT_2 se llevan a cabo efectos fisiológicos antagónicos producidos por el receptor AT_1 como se muestra en la siguiente tabla:

Efectos producidos por la estimulación de Ang II en diversos tejidos.

Tejido	Receptor	Efecto
Vasculatura	AT ₁	Vasoconstricción Hipertrofia y Angiogénesis
	AT ₂	Vasodilatación (NO-GMPc) Inhibición de la hiperplasia y angiogénesis
Corazón	AT ₁	↑ Fuerza de contracción Hipertrofia Fibrosis miocárdica
	AT ₂	↓ Síntesis de colágeno
Riñón	AT ₁	↑ Constricción arteriolar aferente y eferente ↑ Filtración glomerular
Cerebro	AT ₁	↑ Liberación de ADH Estimula la sed y el apetito
Glándula adrenal	AT ₁	↑ Descarga simpática de neurotransmisores ↑ Liberación de aldosterona de la corteza ↑ Liberación de catecolaminas de la médula

Modificado de Pitt and Konstam, 1998; Siragy, 2000

Vasos sanguíneos

La unión de Ang II a los receptores AT₁ en las células del músculo liso vascular produce una respuesta contráctil en los vasos de resistencia. Estudios *in vitro* han demostrado que la Ang II promueve la expresión del protooncogen c-fos en estas células, lo cual a su vez puede activar otros genes y favorecer proliferación celular, lo cual a su vez puede activar otros genes y favorecer proliferación celular (Lyll y col., 1992).

Corazón

Experimentos realizados en ratas han demostrado que la infusión de Ang II puede promover la síntesis y acumulación de colágeno en los compartimientos no miocíticos del corazón, produciendo fibrosis y remodelación ventricular (Brilla y col., 1994).

Glándulas suprarrenales

La aldosterona es liberada en respuesta a la estimulación de los receptores AT₁ por la Ang II en la corteza suprarrenal. Este efecto contribuye a la regulación de sodio y de los fluidos corporales y al mantenimiento de la presión arterial (Tanabe y col., 1998).

Cerebro y pituitaria

La Ang II modula los fluidos y la homeostasis electrolítica por la liberación de la arginina-vasopresina (ADH) de la pituitaria posterior vía la estimulación del núcleo supraóptico del hipotálamo y por la estimulación de algunas regiones cerebrales que controlan la sed. Esto produce un incremento tanto en la presión arterial como en las ganas de beber (Hogarty y col., 1992).

1.1.3 METABOLITOS DE ANG II

En el metabolismo de la Ang II intervienen diversas enzimas, denominadas de manera general angiopeptidasas. Estas enzimas son peptidasas que participan en la degradación de péptidos de angiotensina generando productos activos e inactivos. A este grupo pertenecen las aminopeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas, aunque ninguna es específica (Figura 1).

1.1.3.1 Ang III (2-8)

La Ang III se forma a partir de la Ang II por la enzima aminopeptidasa A y después es metabolizada a Ang IV por la aminopeptidasa N. Este fragmento heptapeptídico es un metabolito activo que tiene una afinidad similar a la Ang II por los receptores AT₁ y AT₂ (Abhold y col., 1987). Se ha demostrado que la administración intracerebroventricular de aminopeptidasa A o Ang III produce efectos centrales similares a los observados después de la inyección de Ang II, los cuales incluyen un incremento en la presión arterial, liberación de vasopresina y consumo de agua (Wright and Harding, 1993). Con el desarrollo de nuevos

inhibidores selectivos de la aminopeptidasa, se ha observado que el efecto de la Ang II sobre la liberación de vasopresina puede depender de la conversión previa de la Ang II a Ang III (Zini y col., 1996).

1.1.3.2 Ang IV (3-8)

La Ang IV es un fragmento hexapeptídico que tiene un sitio de unión designado como el receptor AT_4 , receptor por el cual la Ang II tiene muy baja afinidad; por otro lado el Losartán (antagonista del receptor AT_1), CGP 42112 y el PD 123317 (antagonistas del receptor AT_2) no presentan afinidad por este sitio dentro de los rangos farmacológicos aceptados (Harding y col., 1994). Hasta la fecha el papel fisiológico y la relevancia de la Ang IV, así como de este receptor no han sido caracterizados.

1.1.3.3 Ang (1-7)

El heptapéptido Ang (1-7), constituye otro de los metabolitos de la Ang II, el cual es considerado como un producto biológicamente activo del SRA. Este fragmento es generado a partir de Ang I o Ang II por peptidasas titulares y ha sido identificado en el plasma de animales y humanos. La Ang (1-7) estimula la liberación de vasopresina, prostaglandinas y óxido nítrico al igual que la Ang II, pero no tiene efecto sobre la secreción de aldosterona y la respuesta a la sed. Se ha reportado que la Ang (1-7) tiene efectos antiproliferativos sobre las células del músculo liso vascular y actúa contrariamente a la Ang II como un vasodilatador (Ferrario y col., 1991; Li y col., 1997).

1.2 RECEPTORES DE ANGIOTENSINA

1.2.1 GENERALIDADES

Muchos estudios fisiológicos y farmacológicos en mamíferos demostraron la existencia de una gran diversidad en la población de receptores de Ang II. Mientras que la clonación y secuenciación de los receptores a Ang II, así como el descubrimiento de antagonistas selectivos del receptor a Ang II trajeron un nuevo nivel para la comprensión de la biología de éste péptido (Murphy y col., 1991; Sasaki y col., 1991; Blankley y col., 1991), pues constituyen una herramienta muy importante para la identificación y caracterización de dos principales subtipos de receptores; el receptor AT₁ y el receptor AT₂. De esta manera la clasificación de estos receptores está basada en datos *operacionales, transduccionales y estructurales* de acuerdo a los criterios de clasificación de receptores establecidos por la IUPHAR (International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification); (Gasparo y col., 1995).

Criterio operacional

Se basa en la caracterización del perfil farmacológico del receptor mediante el empleo de agonistas y antagonistas altamente selectivos. Se realiza mediante estudios funcionales con radioligandos que permiten determinar el orden de potencia del agonista y antagonista así como las constantes de disociación para estos ligandos.

Criterio transduccional

Consiste en todos los eventos que se desencadenan después del acoplamiento del receptor-efector; identificando los sistemas transduccionales, ya sea si forman parte integral de un canal iónico o están acoplados a segundos mensajeros que se activan como consecuencia de la interacción del fármaco con el receptor a través de su acoplamiento a una proteína G (s, i, o, q, etc.).

Criterio estructural

Consiste en la determinación de la secuencia de aminoácidos del receptor y su grado de homología relativa. Es importante destacar que los receptores que son estructuralmente diferentes no presentan necesariamente características operacionales diferentes.

A pesar de que estos subtipos de receptores difieren entre sí por su afinidad con varios fragmentos peptídicos de angiotensina, son distinguibles por su selectividad con antagonistas no peptídicos.

1.2.2 RECEPTOR AT₁

1.2.2.1 Distribución y función

La distribución tisular de los receptores AT₁ ha sido ampliamente estudiada tanto en humanos como en animales y su función depende de su localización anatómica. Los receptores AT₁ se encuentran principalmente en el cerebro, vasculatura, glándulas suprarrenales, corazón y riñón, participando en la regulación de la presión arterial y el balance hidroelectrolítico. En el cerebro, ejerce diversas acciones modulando la conducta de beber y la ingesta de sal, así como del control central de la presión arterial. En los vasos sanguíneos, su estimulación produce vasoconstricción y la exposición prolongada de Ang II puede inducir el crecimiento de vasos sanguíneos y proliferación provocando un adelgazamiento y rigidez de la pared del vaso. En las glándulas endocrinas, la estimulación del receptor AT₁ permite la liberación de distintas hormonas como la aldosterona proveniente de la corteza suprarrenal y de las catecolaminas de la médula suprarrenal, además de la vasopresina de la glándula pituitaria. En el corazón, la estimulación del receptor AT₁ produce un efecto inotrópico y cronotrópico positivo por la liberación de catecolaminas de las terminales simpáticas, además provoca hipertrofia del miocito (Siragy, 1999).

Por otro lado se sabe que la Ang II por medio del receptor AT₁ induce la expresión de la COX 2 en células del músculo liso vascular como un importante

mecanismo para la regulación de síntesis de prostanoïdes (Ohnaka K. y col, 1999; Hu Zhuo-Wei, y col, 2002).

1.2.2.2 Características estructurales

El gen del receptor AT_1 fue clonado por primera vez de células del músculo liso vascular de rata (Murphy y col., 1991) y de las glándulas suprarrenales bovinas (Sasaki y col., 1991). El gen del receptor AT_1 codifica para 359 aminoácidos y tiene un peso molecular de 41 kDa. En especies roedoras existen dos subtipos de receptoras AT_1 , denominados AT_{1A} y AT_{1B} . El gen del subtipo AT_{1A} se localiza en el cromosoma 17 y el gen para el receptor AT_{1B} en el cromosoma 2. Ambas isoformas presentan un 94% de homología en la secuencia de aminoácidos y un 60% en las regiones 5' y 3' terminal. En los humanos existe únicamente un gen para el receptor AT_1 , el cual se localiza en el cromosoma 3 (Allen y col., 2000). El gen del subtipo AT_{1A} en la rata posee cuatro exones y tres intrones, y el gen AT_{1B} posee tres exones y dos intrones; en el humano el gen AT_1 posee cuatro o cinco exones únicamente. A pesar de que en todos los subtipos existen múltiples exones, la región codificante se encuentra contenida en un solo exón. De esta manera, aunque se produzca un splicing alternativo del gen, debido a la estructura exónica, se codificaran proteínas idénticas (Griending y col., 1996). Los receptores AT_{1A} se encuentran de manera predominante en el riñón, pulmón, hígado y músculo liso vascular, mientras los receptores AT_{1B} se expresan principalmente en las glándulas suprarrenales y pituitaria anterior (Dinh y col., 2001).

1.2.2.3 Propiedades farmacológicas

Los receptores AT_1 se distinguen por su afinidad selectiva a los bifenilimidazoles tipificados por el losartán, y por su insensibilidad a tetrahydroimidazopiridinas, como el PD 123319. Algunos bloqueadores de estos receptores son el valsartán, candesartán, eprosartán, irbesartán y telmisartán (Figura 3). Dichos compuestos son antagonistas no peptídicos de los receptores AT_1 con alta afinidad sin ejercer efectos agonistas y sin afinidad por los receptores

AT₂ a las concentraciones recomendadas (Timmemans y col., 1993). Estos compuestos pueden atravesar la barrera hemato-encefálica más fácil que los inhibidores de la ECA y presentar una mayor acción para inhibir efectos centrales (Unger y col., 1996).

En un inicio, fueron sintetizados algunos análogos peptídicos de Ang II con afinidad por los receptores AT₁ como la saralasin (Sar¹-Ala⁸-Angiotensina II), el primer antagonista peptídico selectivo de Ang II. Sin embargo, su corta vida media, su administración por vía parenteral, así como sus efectos agonistas, limitaron su potencial terapéutico (Anderson y col., 1977). Tiempo después, se descubrió el losartán, primer antagonista no peptídico del receptor AT₁ desarrollado por Du Pont Merck Pharmaceutical Company. En algunas especies, como en humanos y en ratas, el losartán es activo por sí mismo y se convierte en un metabolito activo denominado EXP3174.

Los receptores AT₁ poseen una mayor afinidad por la Ang I y Ang II que por la Ang III. Además, un aspecto distintivo de dichos receptores lo constituye la disminución de su afinidad y capacidad de unión por la Ang II en presencia de agentes sulfhidrilo reductores como el ditioneitol (DTT) y los análogos de GTP (M de Gasparo, 2000).

1.2.2.4 Mecanismos transduccionales

La unión de la Ang II al receptor AT₁ permite la activación de distintas fosfolipasas, que incluyen la PLA₂ y PLD, quienes son responsables de la generación de prostaglandinas (PG's) (Griendling y col., 1996) y la PLC, la cual hidroliza el fosfatidil 4,5-bifosfato a la forma de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ estimula la liberación del calcio de compartimentos intracelulares, mientras el DAG incrementa la actividad de la PKC, produciendo ambos vasoconstricción (Griendling y col., 1996; Caponni, 1996). Por otro lado, la estimulación de éste receptor inhibe a la adenilato ciclase y permite la reducción del AMPc. Debido a que el AMPc es un vasodilatador, su disminución puede

contribuir en la vasoconstricción inducida por Ang II. Además la activación del receptor AT_1 permite la apertura de canales de calcio y el influjo de calcio extracelular hacia el interior de la célula; un mecanismo que contribuye con la estimulación de la producción y secreción de aldosterona por la Ang II, así como de la vasoconstricción (Siragy, 1999). En la Figura 4 se detallan los mecanismos transduccionales implicados al receptor AT_1 , donde se observa que la unión de la Ang II al receptor AT_1 estimula la activación de PLC y Src tirosina cinasas en segundos, constituyendo así los eventos vasculares inmediatos de señalización, mientras que la activación de PLA₂ y PLD, tirosina cinasas y Proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) ocurre en minutos, por lo que es un proceso de señalización mediata. Por otro lado la generación de especies reactivas de oxígeno, expresión de protooncogenes, y síntesis de proteínas se llevan a cabo en cuestión de horas y marcan los eventos de señalización tardía (Rhian M., 2000).

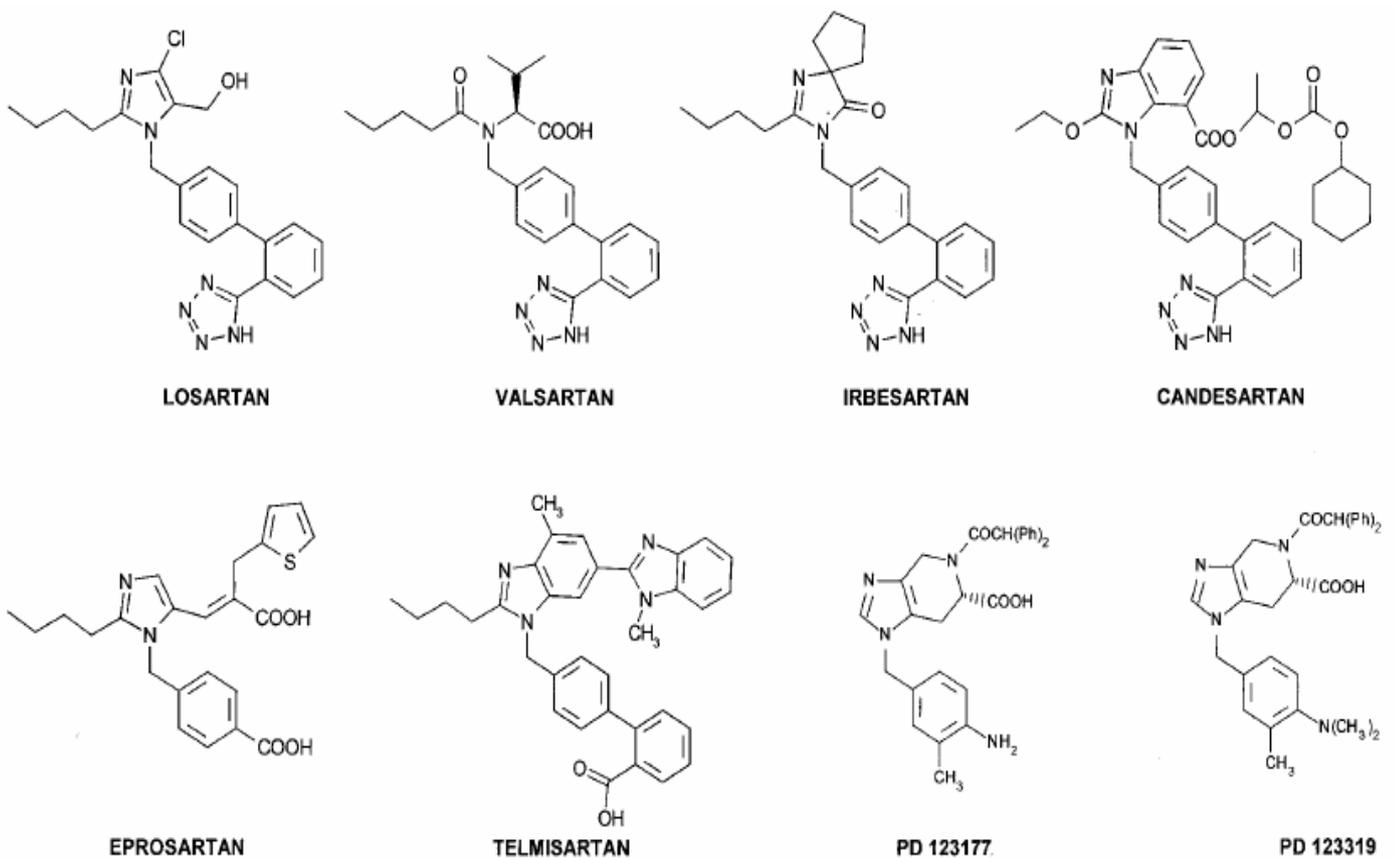


Figura 3. Estructura de los antagonistas no péptidos de los receptores AT_1 y AT_2 (Modificado de Gasparo M, 2000)

1.2.3 RECEPTOR AT₂

1.2.3.1 Distribución y función

Los receptores AT₂ se encontraron en un principio de manera más abundante en tejido embrionario y en neonatos, identificándose en el mesénquima de los fetos y en ciertas áreas del cerebro fetal, así como en aorta neonatal (Grady EF, 1992; Millan MA, 1991; Viswathan M, 1991; Tsutsumi K, 1991). Se han identificado estos receptores en arteria cerebral de rata, aorta, cerebro y en corazón de conejo, así como en aorta, corteza cerebral y corazón de monos en animales inmaduros (Tsutsumi K, 1991; Chang RSL, 1991). Aunque es relativamente baja la expresión del receptor AT₂ en tejido de adultos, se ha reportado en útero, ovario, médula adrenal, riñón y en distintas áreas del cerebro (Zhuo y col., 1995; Gasparo y col., 2000; Roulston y col., 2003).

Un aspecto de la función renal que ha recibido atención es el papel en la natriuresis debido a la oposición de los efectos antinatriuréticos de la activación del receptor AT₁. Se ha demostrado que el PD123319 (antagonista AT₂) disminuye la excreción urinaria de sodio en ratas hipertensas, mientras que el valsartán ejerce los efectos contrarios (Siragy and Carey, 1999)

Algunas patologías pueden afectar la expresión de los receptores AT₂. En 1995 Nakajima demostró que la expresión del RNAm del receptor AT₂ aumenta cuando se provocaba daño con balón en las arterias carótidas de rata (Najakima y col., 1995). En un modelo de inflamación espontánea en arteria femoral de ratón se encontró una sobre expresión de estos receptores en la media y neoíntima de la arteria (Akishita y col., 2000a). Además la regulación de los receptores AT₂ se lleva a cabo en la vasculatura por la ANG II, pues se ha demostrado que infusiones crónicas de éste péptido disminuye la expresión de estos receptores en arteria uterina de borrego. (Mc Mullen, y col., 2001). Algunos estudios *in vivo* con delección genética o sobreexpresión de receptores AT₂ muestran que éstos

inhiben las funciones mediadas por los receptores AT₁ (Hein y col., 1995; Ichiki, T. y col., 1995; Masaka, H., y col., 1998; Horiuchi, M y col., 1999).

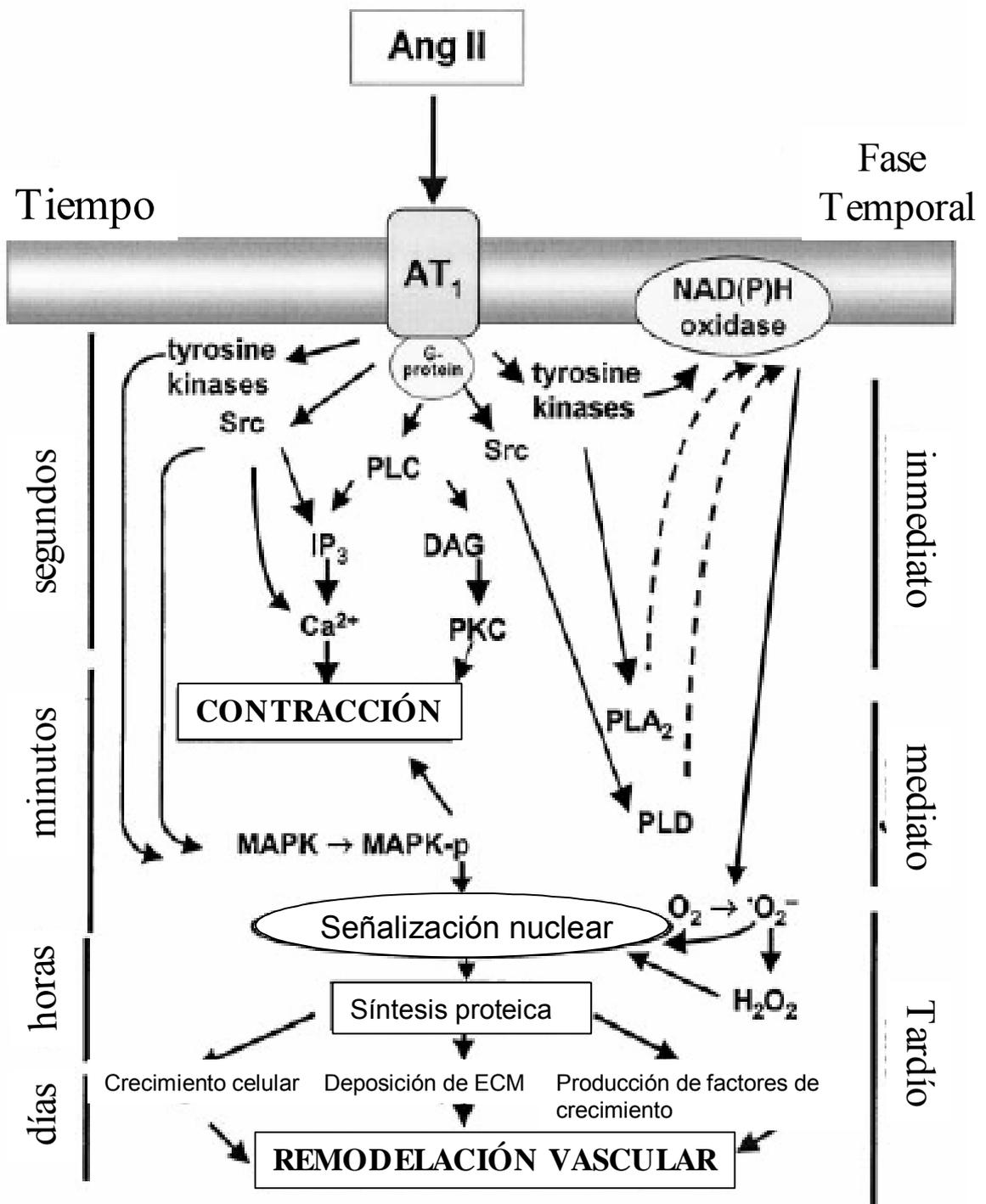


Figura 4. Eventos de señalización en un curso temporal mediados por la Ang II en células de músculo liso vascular. Modificada de Rhian M. Touyz and Schiffrin E. 2000

1.2.3.2 Mecanismos transduccionales

El efecto inhibitorio del receptor AT_2 se atribuye a una activación de protein-fosfatasa mediada por activación de éste (Horiuchi, M., y col., 1999). Sin embargo en muchos sistemas la inhibición de la señalización del receptor AT_1 mediada por el AT_2 persiste en presencia de antagonistas específicos al AT_2 (Akashita, M., y col., 1999; Cox, B., y col. 1996) sugiriendo que las funciones mediadas por éste son independientes de una interacción del agonista al mismo. También se ha demostrado que el receptor AT_2 antagoniza al AT_1 mediante la formación de un heterodímero entre ambos receptores y de ésta manera se produce un desacoplamiento del receptor AT_1 impidiendo que se lleve a cabo su mecanismo transduccional, por lo que el AT_2 es el primer receptor acoplado a proteínas G que actúa como un antagonista específico de receptor. (AbdAlla, S., y col., 2001).

Algunos estudios han demostrado un acoplamiento entre la activación del receptor AT_2 y alteraciones en niveles celulares de Monofosfato de guanosina cíclica (GMPc). La Ang II produce un incremento de niveles de GMPc, en cultivos de células endoteliales de aorta de bovinos dependiente de ON mediado por el receptor AT_2 (Wiemer y col., 1993; Saito y col., 1996) y también se ha reportado que la Ang II estimula la liberación de ON en vasos sanguíneos aislados por medio del mismo receptor (Seyedi y col., 1995; Thorup y col., 1998; Thorup y col., 1999). En microvasos coronarios de perro y arterias coronarias grandes, la Ang II induce un aumento en niveles de ON, suprimido por los antagonistas de los receptores AT_1 y AT_2 (losartan y PD123319, respectivamente), así como por el antagonista no selectivo de los receptores de Ang II, saralasin (Seyedi y col., 1995).

Un estudio realizado por Siragy y col. (1996) en perros concientes uninefrectomizados inició el concepto de que el receptor AT_2 puede estimular la liberación de bradicinina endógena, además de ON in vivo. Estudios subsecuentes han revelado que la Ang II endógena (después de la restricción dietética de sodio)

y la infusión de Ang II exógena estimula un aumento del GMP cíclico en el líquido intersticial renal de ratas conscientes; un efecto que es suprimido por el bloqueo del receptor AT₂ (Siragy y Carey, 1996) o por el oligonucleótido antisentido del receptor AT₂ (Moore y col., 2001), así como la inhibición SON (Siragy y Carey, 1997, 1999; Siragy y col., 2000) y bloqueo del receptor de bradicinina B₂ (Siragy y Carey, 1999; Siragy y col., 2000; 2001). En un modelo renal de hipertensión, la infusión de Ang II produjo un aumento de bradicinina mediado por medio del receptor AT₂ (Siragy y Carey, 1999), confirmando que existe un acoplamiento directo entre la activación del receptor AT₂ y la subsecuente síntesis/liberación de bradicinina.

1.3 CAMBIOS CARDIOVASCULARES ASOCIADOS AL EMBARAZO

Existen diversas modificaciones a nivel sistémico durante el embarazo, que son anatómicas, fisiológicas y bioquímicas. Estas modificaciones varían desde el momento de la fertilización hasta incluso el período del posparto para después retornar a un estado completamente normal.

El embarazo es un estado fisiológico que se caracteriza por una respuesta vascular atenuada a sustancias vasoconstrictoras (Chu and Beilin, 1993). Estos cambios se han asociado a un incremento en la liberación de sustancias vasodilatadoras de origen endotelial (Conrad, 1989; Weiner, 1991; Pdjarnay, 1994). Una de las características más sorprendentes del embarazo es que la presión sanguínea y la resistencia periférica descienden tras la concepción. Este evento se presenta a pesar de que el gasto cardiaco aumenta en el primer trimestre, alcanzando un máximo de 30 a 40 % sobre los niveles de las no embarazadas por la semana 24 de gestación. (DeSwiet, 1980). A pesar del incremento en el gasto

cardiaco, cae la presión sanguínea por la disminución en la resistencia vascular. Adicionalmente, se incrementa el volumen sanguíneo aproximadamente en un 50% comenzando en el primer trimestre.

Los cambios fisiológicos que ocurren en el aparato cardiovascular se asocian con un descenso en la resistencia vascular sistémica. En mujeres embarazadas este descenso puede evidenciarse, incluso, desde las 5 semanas de embarazo (Cockell AP, 1997; Robson SC, 1989; Halligan A, 1993) y se manifiesta por una disminución progresiva de la presión arterial en los dos primeros trimestres. Así, se ha demostrado un incremento en la biosíntesis del ON durante el embarazo en ratas y cobayos (Conrad, 1993; Weiner, 1994), sin embargo, otros autores han demostrado que también existe un incremento en la producción de otros mediadores vasorrelajantes como las prostaglandinas (Conrad, 1986) o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Bobadilla, 1997) durante este período fisiológico.

El embarazo está asociado a una disminución en la resistencia vascular lo cual contribuye a mantener una disminución en la presión sanguínea materna a pesar del marcado incremento en el volumen sanguíneo y el gasto cardiaco; un mal funcionamiento en este mecanismo se le ha vinculado con el estado de pre-eclampsia (Gant y col., 1987). Se sabe que durante el embarazo la síntesis y actividad del ON están aumentadas (Poston y col., 1995; Weiner y col., 1991), y que existe un incremento en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a acetilcolina (ACh) mediada por el ON (Bell y col., 1982; Weiner y col., 1991). Sin embargo durante el embarazo la respuesta a vasoconstrictores incluyendo noradrenalina (NA), Ang II y vasopresina está disminuida *in vivo e in vitro* (Chu., et al 1993a; D'Angelo y col., 1993). En este periodo, la disminución de la respuesta vasoconstrictora obtenida de animales embarazados ha sido descrita *in vitro*, sugiriendo que los cambios observados, involucran al músculo liso vascular, al endotelio y/o nervios perivasculares. Por su parte Parent y cols. (1991) se refieren a la posible existencia de cambios a nivel de receptores específicos en el

embarazo, sin embargo una disminución no específica en la respuesta vasoconstrictora a varios agonistas sugiere que un mecanismo general se encuentra involucrado en este fenómeno.

Por otro lado, existen estudios que sugieren que la atenuación de las respuestas vasculares durante el embarazo dependen del lecho vascular estudiado (Weiner C., 1991), se han reportado diferencias en la reactividad vascular de diferentes segmentos aórticos en cobayos preñados (Gregg AR., 1995) además se demostró que el embarazo atenúa la respuesta vascular a metoxamina en anillos de aorta de ratas preñadas y que al inhibir a la SON se observa que la modulación del ON sobre la contracción inducida por metoxamina es evidente durante el embarazo sólo en el segmento torácico, indicando que existe una diferencia funcional entre ambos segmentos de la aorta (Bobadilla RA., 1997) y la respuesta contráctil a 5-hidroxitriptamina se encuentra atenuada durante el embarazo siendo más acentuado en el segmento abdominal de la aorta de rata comparado con el segmento torácico, y se ha demostrado también que la expresión de las enzimas COX-1, COX-2 y NOSe se incrementan sólo en el segmento abdominal de ratas embarazadas, lo que sugiere que el efecto del embarazo no es homogéneo a lo largo de la aorta (Bobadilla y col., 2004).

1.3.1 Mediadores endoteliales en los cambios vasculares durante el embarazo.

Los mecanismos responsables de la vasodilatación durante el embarazo no han sido completamente esclarecidos y han sido principalmente atribuidos a un aumento en la producción de ON del endotelio vascular, aunado a un incremento en la expresión de la SONE (Magness y Rosenfeld, 1996).

Como ya se mencionó, parece ser que la expresión de la SONE, puede ser regulada por una variedad de factores incluyendo los estrógenos (Hayashi y Yamada, 1995), los cuales están aumentados durante el embarazo. Un aumento

en la inducción de las SON y de los estrógenos en la etapa inicial del embarazo apoyan el concepto de que estas enzimas puedan intervenir en las adaptaciones del músculo liso vascular durante el embarazo (Weiner y col., 1994 a, b) sin embargo, la información sigue siendo contradictoria.

Así, en la preparación de arteria mesentérica aislada de rata embarazada, se encontró que existe un incremento en la vasodilatación dependiente de endotelio y disminución de la respuesta vasoconstrictil; sin embargo, el fracaso en la utilización de un inhibidor de las SON para normalizar la vasoconstricción en estos vasos, sugirió que la respuesta disminuida a los mediadores vasoconstrictores no es debida a la modulación por el ON (Davidge y McLaughlin, 1992; Chu y Beilin, 1993 a, b), de manera adicional estos autores también sugieren que, los productos de la vía de la COX no están involucrados en la atenuación de la respuesta vasoconstrictora de la arteria mesentérica de la rata en el embarazo.

1.3.2 La síntesis de prostaglandinas en el embarazo.

Se sabe que las PG son importantes autacoides reguladores de la microcirculación a nivel de pequeñas arteriolas localizadas en diferentes lechos vasculares y que responden a diferentes estímulos. Así, se ha visto que en la médula renal las PG antagonizan el efecto vasoconstrictor de agentes tales como Ang II, NA y vasopresina (Dibona, 1986; Mené, 1992) pero su participación durante el embarazo no se conoce del todo.

La resistencia a la Ang II, noradrenalina (NA) y arginina vasopresina ocurre de forma temprana en animales preñados y se ha atribuido por algunos autores al incremento de la síntesis de PG vasodilatadoras (Paller, 1989) aunque el estímulo para el aumento en la síntesis de PG durante el embarazo es desconocido. Así, la causa de la vasodilatación renal inducida en el embarazo sigue siendo desconocida, si bien se sabe que existe un incremento en la excreción urinaria de

PGI₂ y PGE₂ y (Brown, 1988; Conrad, 1987), y que la administración exógena de PGE₂ y PGI₂ da por resultado una vasodilatación renal e incremento del flujo sanguíneo renal.

El embarazo se ha asociado a un incremento en la síntesis tanto de PGI₂ como de tromboxano A₂ (TXA₂). Los tejidos placentarios son capaces de generar PGI₂ y la arteria umbilical tiene unas 10 a 100 veces más capacidad de sintetizar PGI₂ con respecto a otras arterias (Kawano, 1983; Bussolino, 1980; Dadak, 1982). Se ha demostrado que existe una disminución en la síntesis de PGI₂ en muestras de arteria umbilical de mujeres con preeclampsia (Dadak, 1982; Koullapis, 1982), y que en el pseudoembarazo, inducido por la administración de prolactina en ratas acopladas con machos estériles, se incrementó la excreción de PGE₂ urinaria por mas de 10 días con una caída de la resistencia vascular periférica y resistencia a Ang II y NA (Paller, 1989). Este hallazgo en el pseudoembarazo indica que la concepción no es necesaria para incrementar la síntesis de PG y sugieren que un cambio hormonal activa al sistema nervioso central. Es muy curioso saber que el embarazo tiene muchas similitudes con el síndrome de Bartter; un trastorno caracterizado por insensibilidad a la Ang II, aumento plasmático de renina con una baja concentración de Ang II, con disminución de la presión sanguínea y aumento de la síntesis de PG (Gill JR, 1980).

1.3.3 Sistema Renina Angiotensina y embarazo

La disminución del volumen circulante por cualquier motivo produce disminución de la presión arterial y por lo tanto de la perfusión renal. La hipoperfusión renal estimula la secreción de renina que se une al angiotensinógeno para producir angiotensina I y esta angiotensina II por medio de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). La Ang II produce vasoconstricción y estimula la secreción de aldosterona. Finalmente la presión arterial alcanza sus valores normales por dos mecanismos: el aumento de las resistencias vasculares periféricas y la retención de sodio y agua.

El nivel de angiotensina en el plasma depende de varios factores: de la concentración de renina en el plasma, de la concentración de sustrato como es el angiotensinógeno, la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, y de la actividad de la angiotensinasa tisular. Bajo muchas circunstancias la concentración de renina en el plasma es el determinante más importante de la concentración de Ang II en el plasma. En el embarazo, existe un incremento tanto de angiotensinógeno como de renina, siendo el triple o cuádruple la concentración de angiotensinógeno y ocho veces más alta la concentración plasmática de renina que en las mujeres no embarazadas.

La paradoja del embarazo es que la elevación de la secreción de renina ocurre durante la expansión del volumen extracelular y el aumento del sodio filtrado hacia el túbulo distal, ambos deberían causar la caída de la secreción de la renina por los mecanismos de la mácula densa y del barorreceptor. El aumento en la secreción de renina se debe probablemente al aumento en la síntesis de PGI₂, el cual directamente incrementa la secreción renal y causa la resistencia a la Ang II en la resistencia periférica vascular. El precursor de la renina, la prorenina circulante en el plasma constituye el 80 a 90% de la forma inactiva de la renina y está elevada durante todo el embarazo. El útero, la placenta y los ovarios sintetizan prorenina en altas concentraciones y la liberación de la prorenina del útero ocurre con reducción en el flujo sanguíneo uterino. Sealy y cols. (1973) sugirieron que la presencia de prorenina en la arteriola aferente del riñón y el útero probablemente es como resultado un fenómeno de taquifilaxia a angiotensina II que causaría la resistencia a la circulación de la misma. La presencia de la COX-2 en la mácula densa y alrededor de la segmento de la rama ascendente cortical ha sugerido que los prostanoïdes generados por las células de la mácula densa juegan una función en el aparato yuxtglomerular mediando la regulación del tono vascular (feedback tubuloglomerular) y/o secreción de renina, observación funcional apoyada por Briggs y cols en 1993.

Con frecuencia la placenta funciona como si estuviera regulada por un sistema de presión sistémico. El sistema renina angiotensina aldosterona es importante para mantener la presión de la circulación sistémica y la homeostasis. En el caso del riñón, la disminución de la presión propicia un incremento en la producción de renina la cual desencadena una serie de eventos que culminan en un incremento de la presión arterial materna durante el embarazo. Se ha visto que los desencadenantes para este incremento de la presión arterial es la disminución en el flujo uteroplacentario a través de las arterias espirales maternas. La señal que la placenta utiliza para inducir estos cambios es desconocida, pero al haber renina en la placenta sugiere que esta hormona puede funcionar en la placenta como en el riñón.

En el año de 1973 Gant y cols., realizaron un estudio prospectivo sobre la reactividad vascular administrando Angiotensina II por vía intravenosa a mujeres embarazadas, se observó que las mujeres embarazadas normotensas presentaban una atenuación en la respuesta de los efectos presores de la angiotensina II, con respecto a las no embarazadas, en contraste las mujeres que desarrollaron hipertensión asociada al embarazo perdieron de manera progresiva su refractariedad. Posteriormente se propuso que la refractariedad a la angiotensina II era consecuencia de la refractariedad individual de los vasos sanguíneos (Gant y col., 1974).

Existe amplia evidencia de que la atenuación de la respuesta presora a la angiotensina II durante el embarazo, ocurre tanto en animales como en humanos y otros mamíferos (Pan ZR y col. 1990; Gant y col, 1973; Rosenfeld CR y Gant NF, 1981). Se sabe que el embarazo en ratas y en humanos varía en algunos aspectos, como son duración de la gestación, ambiente hormonal, anatomía del útero y número de fetos, sin embargo en la rata también se observan cambios durante el embarazo similares a los humanos, que se pueden traspolar mutuamente (St Louis, Jean y col. 2001; Conrad and Morganelli, 1989).

Como la respuesta presora a Ang II esta mediada por receptores vasculares específicos se ha propuesto que existen modificaciones en los receptores vasculares a Ang II durante el embarazo lo cual podría explicar la disminución en la respuesta presora de los elevados niveles de Ang II en sangre. Inicialmente se propuso que había una regulación a la baja de receptores a Ang II y esto producía a su vez la disminución de la respuesta a Ang II circulante (Siddiqui y col., 1983). Tiempo después se demostró en arteria mesentérica de rata (Parent y col., 1991), en aorta, arterias mesentérica y uterina de borrego (Mackanjee y col.,1991; Rosenfeld y col.,1993; Cox y col., 1996a), y en arterias uterinas de mujeres embarazadas (Cox et al., 1996b) que el número de receptores a Ang II en músculo liso vascular no se modificaba durante el embarazo, por lo que después se sugirió que la proporción de los subtipos de receptores a Ang II se modifica durante el embarazo sin alterar la densidad total de receptores durante el mismo. En otros estudios se ha demostrado que la expresión de los receptores a Ang II se modifica durante el embarazo, de esta manera tenemos que durante el embarazo existe una sobre expresión de receptores AT₂ en arteria uterina, y que la hipertrofia del miometrio durante el embarazo puede estar mediada por los receptores AT₂. (Blair E. Cox, 1996). Estudios en humanos y en roedores sugieren que la expresión de los receptores AT₁ está controlada por algunos factores hormonales que resultan en cambios en la expresión del RNAm que codifica para este receptor (Sandberg K, 1994). Además en células endoteliales de arteria uterina de ovino se demostró que el embarazo induce un incremento en la expresión de los receptores AT₁ (Ian M. Bird, y col., 1998). En arteria uterina de ovinos preñados se encontró que la densidad de receptores a AT₂ incrementaron durante el embarazo mientras que los de los receptores a AT₁ no se modificaron (Burrell, J., y col., 1997).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El embarazo es un estado fisiológico en donde se presentan cambios a nivel sistémico, entre los cambios cardiovasculares se encuentra un aumento en la Ang II circulante con disminución de las respuestas vasoconstrictoras.

Hasta la fecha no se conoce cual es el mecanismo por el que ocurre éste fenómeno por lo que resulta interesante explorar si en parte, esto se debe a cambios en los receptores a Ang II y a la formación de un heterodímero AT_1/AT_2 y si estos cambios repercuten en la participación de otros factores vasoactivos.

3. HIPÓTESIS

En la aorta de rata embarazada existe una disminución de la respuesta contráctil de manera regionalizada a Ang II, esto debido a que existe una modificación en la proporción de los receptores de Ang II repercutiendo en la participación del ON y las PG.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel que ejerce el embarazo sobre la reactividad vascular a Ang II en anillos de aorta de rata en sus dos segmentos, la regulación que ejerce sobre los receptores a Ang II y si estos repercuten en la liberación de sustancias vasoactivas.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Investigar si el embarazo modifica la presencia y expresión proteica de los receptores AT_1 y AT_2 en las porciones torácica y abdominal de aorta de rata.
- b) Investigar si en la aorta de rata en sus segmentos torácico y abdominal ocurre heterodimerización de los receptores AT_1/AT_2 , y si éste se modifica durante el embarazo.
- c) Determinar que la respuesta contráctil a Ang II en anillos de aorta de rata se encuentra disminuida durante el embarazo y que existen diferencias en la respuesta en ambos segmentos de la aorta.
- d) Investigar la participación de las PG y ON en la reactividad vascular inducida por Ang II durante el embarazo en aorta de rata.
- e) Investigar si el embarazo modifica la presencia y expresión génica de las isoformas de COX y la SONE en la aorta de rata en sus dos segmentos.

6. MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en tejido vascular aórtico obtenido de ratas embarazadas (día 19-21 de la gestación) y no embarazadas de entre 4 y 5 meses de edad de la cepa Wistar. Los animales se mantuvieron con alimento común para rata (Hartman) y agua *ad libitum*. El peso de los animales al momento de la experimentación fue de 200-250 g antes del embarazo.

Las ratas se acoplaron con los machos y el día en que se encontraron espermatozoides en el frotis vaginal se consideró el primer día del embarazo. La gestación se confirmó posteriormente mediante la observación de las crías *in útero* al momento de remover los vasos sanguíneos. Se dividieron dos grupos de estudio; ratas control (sin embarazo) y ratas con 21 días de embarazo. Los animales de cada grupo se sacrificaron en una cámara de éter y se disecaron para la obtención de la aorta en sus dos segmentos para realizar cada una de las metodologías requeridas. Se emplearon técnicas humanitarias de manejo de animales.

7. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

7.1 Análisis de la expresión proteica de los receptores a Ang II y de las isoformas de la COX y SONE en aorta torácica y abdominal de rata.

Para la determinación de la expresión proteica de los receptores a Ang II (AT₁ y AT₂) y de las isoformas de la COX y SONE se realizó la técnica de Inmunoblot. Para esto se sacrificaron los animales de ambos grupos (no embarazadas y embarazadas de 21 días) en una cámara de éter, se realizó una laparotomía toraco-abdominal en la línea media escindiendo la totalidad de la aorta descendente (segmento torácico y abdominal), la cual fue colocada en una solución de Tris HCl pH 7.4, 0.1 M a 4°C para la remoción de tejido conectivo y grasa. Una vez limpia la aorta se dividió en sus segmentos torácico y abdominal tomando como referencia el diafragma y descartando dos segmentos de 5 mm de largo proximales y distales al mismo, ambos segmentos fueron a su vez colocados en tubos de ensayo que contenían 1 ml para el segmento torácico y 0.5 ml para el abdominal de Tris HCl pH 7.4, 0.1 M, así como 10 µl/ml de un cóctel de inhibidores de las proteasas (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, PMSF; Nαp-Tosyl-Lysine Chloro methy Ketona, TLCK; Iodoacetamida, IAA; Sigma®) a 4°C en hielo para los segmentos torácico y abdominal respectivamente. Se homogenizaron con un Tissue-Tearor-Biospec product® a 25'000 RPM. El homogenado se colocó en tubos de microcentrífuga de 500 µl y se centrifugaron a 3000 RPM a 4°C por 5 minutos, pasado este tiempo se obtuvo el sobrenadante el cual a su vez se dividió en dos partes, una para la determinación de la concentración de proteínas y otra para la realización del Inmunoblot.

La determinación de la concentración de proteínas se calcula mediante la técnica de Bradford la cual se modificó para hacer las lecturas en un equipo de ELISA, para esto se realizó una curva estándar por el método de Bradford como se muestra en el siguiente cuadro:

Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford

Curva estándar:

TUBO	PBS 1X (μ l)	ALBÚMINA 0.1 μ g/ μ l (μ l)	BRADFORD (μ l)
1	160	0	40
2	150	10	40
3	140	20	40
4	120	40	40
5	100	60	40
6	80	80	40
7	60	100	40

y se realizó además una curva problema, dónde se utilizó el sobrenadante para el cálculo de las proteínas siguiendo la relación mostrada en el cuadro:

Curva de proteínas:

PBS 1X (μ l)	SOBRENADANTE (μ l)	BRADFORD (μ l)
155	5	40

las mezclas de los cuadros anteriores se realizaron en placas de 64 pozos, y la lectura de las absorbancias se hicieron con un filtro de 595 nm, una vez hechas las lecturas se hizo una regresión lineal de la curva estándar para calcular la concentración proteica en μ g/ μ l de las muestras utilizadas, después se calcularon los μ l necesarios para una concentración de 70 μ g/ μ l que fue la cantidad cargada en los pozos de los geles de poliacrilamida para la electroforesis.

7.2 Elaboración de geles de poliacrilamida

Para la determinación de la expresión proteica fue necesario correr las muestras homogenizadas en geles de poliacrilamida en diferentes concentraciones; para esto se usó el equipo de electroforesis MiniProtean III de BioRad. La preparación de los geles se realizó de la siguiente manera; se lavaron

perfectamente los cristales, separadores y cámaras del equipo con agua y detergente. Se dejaron secar y se limpiaron con algodón y metanol, para retirar impurezas o grasa. Una vez listas las cámaras, se prepararon soluciones para el gel de corrida al 10% para la determinación de las enzimas COX-1 y COX-2, así como para la determinación de los receptores AT₁ y AT₂, así como para la β-actina, se prepararon también geles al 8% para la determinación de la enzima SONE; y para el gel concentrador al 6%; se utilizaron las siguientes fórmulas para la preparación de geles de 1.5 mm de grosor:

Gel de corrida

	Poliacrilamida al 8%	Poliacrilamida al 10%
Agua desionizada	4.6 ml	4 ml
Archilamida-Bis archilamida al 30%	2.7 ml	3.3 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.006 ml	0.004 ml

Gel concentrador, poliacrilamida al 6%

Agua desionizada	1.4 ml
Archilamida-Bis archilamida al 30%	0.33 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

Después de que se preparó el gel de corrida, se vació a la cámara hasta 1.5 cm antes del borde superior de las placas, el volumen total se completó con

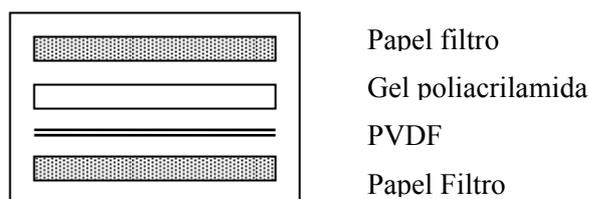
alcohol isopropílico y la cámara se niveló con un nivel de burbuja, para formar una interfaz homogénea y lineal. Se deja polimerizar durante unos 30 a 40 minutos; pasado éste tiempo el isopropanol se tiró de la cámara y se enjuagó con agua desionizada, el agua que quedó en las paredes de los cristales se secó con papel filtro con cuidado de no tocar el gel con el papel, una vez seco, el gel concentrador se colocó rápidamente llenando hasta el borde de las placas de vidrio y se colocó el peine para que se hicieran 10 pozos, cualquier derrame de solución de acrilamida que se produjo se limpió con papel. Se dejó polimerizar por unos 10 a 15 minutos, al término de éste tiempo se retiró el peine y los geles estuvieron listos para correrse.

Las proteínas del homogenado obtenido para el inmunoblot se desnaturalizaron en un baño a 100 °C con Buffer de carga en condiciones reductoras (al Buffer de carga se le agrega β -mercaptoetanol al 10%) por 10 minutos. Las muestras fueron cargadas en el gel a razón de 70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y en el primer pozo se cargó el marcador de PM (Kaleidoscope prestained Standards, high range, BioRad ®), en un mismo gel de 10 pozos se colocaron cuatro muestras de aorta torácica del grupo control y cuatro muestras de aorta torácica del grupo de animales preñados, de la misma forma en otro gel se colocaron cuatro muestras de aorta abdominal del grupo control y cuatro muestras de aorta abdominal del grupo de animales preñados, por cada proteína a determinar en el segmento torácico y abdominal de la aorta se preparó un gel como se muestra en la siguiente tabla:

Proteína a determinar	Número de geles preparados
COX-1 aorta torácica	1
COX-1 aorta abdominal	1
COX-2 aorta torácica	1
COX-2 aorta abdominal	1
NOSe aorta torácica	1
NOSe aorta abdominal	1

Receptor AT ₁ aorta torácica	1
Receptor AT ₁ aorta abdominal	1
Receptor AT ₂ aorta torácica	1
Receptor AT ₂ aorta abdominal	1
β-actina aorta torácica	1
β-actina aorta abdominal	1
TOTAL	12

La electroforesis se corrió en la cámara correspondiente usando buffer de corrida de Tris-Glicina-SDS pH 8.3, a un voltaje de 88 volts durante 1.5 a 2 horas. Una vez terminada la corrida se llevó a cabo la transferencia a una membrana de Polyvinilidene Difluoride (PVDF, Hybond-P, Amersham ®), para este paso se empleó un sistema Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell de BioRad ®. Para llevar a cabo esto fue necesario colocar en la unidad de transferencia primero el papel filtro prehumedecido en el buffer de transferencia, después se colocó la membrana de PVDF la cual fue prehumedecida en metanol absoluto por aproximadamente 10 minutos y después en el buffer de transferencia por 5 minutos más, una vez colocada ésta, se colocó encima el gel y después otro papel filtro de tal forma que se formara un “sándwich” en la unidad de transferencia de la siguiente manera:



Se procuró quitar el exceso de Buffer de la unidad y el amperaje se cuidó durante toda la transferencia. Fue necesario usar una fuente de poder controlada por microprocesador debido a las corrientes tan altas que se usan y el bajo volumen de Buffer usado. La transferencia se llevó a cabo aplicando una corriente de 15 volts por 45 minutos de manera continua. Una vez terminada la transferencia, las membranas de PVDF en donde se transfirieron las proteínas fueron retiradas y sumergidas a una solución bloqueadora de TBST-leche al 5%

por una hora a temperatura ambiente, con la finalidad de bloquear el resto de la membrana donde no hay proteínas transferidas. Después de éste tiempo se hizo un lavado con TBST sin leche por 10 minutos y se incubó cada membrana con el anticuerpo primario, una contra el receptor AT₁, otra contra el AT₂, otra más contra la COX-2, y una más para la SONE (todos estos fueron anticuerpos policlonales de conejo, Santa Cruz, CA, USA ®) la membrana que se incubó contra COX-1 fue con un anticuerpo policlonal de chivo, Santa Cruz, CA, USA®, todas las diluciones de los anticuerpos primarios fueron de 1:400 en TBST-leche al 5% a 4°C durante toda la noche en agitación continua y cuidando de tapar los recipientes donde se acomodaron cada una de las membranas correspondientes para evitar que se el líquido se evaporara durante la agitación. Al término de esto, se hicieron tres lavados con TBST sin leche por 10 minutos a cada una y se incubaron con el segundo anticuerpo, el cual es un anticuerpo contra la especie en donde se realizó el primer anticuerpo, de esta manera para los anticuerpos primarios policlonales de conejo se utilizó un anticuerpo secundario policlonal chivo-anticonejo-peroxidasa, y para el anticuerpo primario policlonal de chivo se utilizó un anticuerpo secundario policlonal burro-antichivo-peroxidasa; Santa Cruz, CA, USA ®; disueltos en TBST-leche al 5% a una dilución 1:1000 por 2 horas; pasado este tiempo se hicieron tres lavados con TBST sin leche por 10 minutos cada uno. Una vez terminado lo anterior se reveló por inmunoquimioluminiscencia (Luminol, Santa Cruz, CA, USA®) exponiendo la membrana durante un minuto en 1 ml de reactivo para después exponerla a una película Hyperfilm de Amersham ® en un Casete de exposición (Spectroline ®) durante 0.5, 1 y 5 minutos, todo esto realizado en un cuarto oscuro para evitar que la película se velara, con las siguientes condiciones de revelado: Revelador 5 minutos, Agua 1 minuto, Fijador 10 minutos, Agua 10 minutos. La cuantificación de las proteínas se realizaron por medio de un método semicuantitativo densitométrico utilizando el programa Quantity One, BioRad®.

La presencia relativa de cada proteína se normalizó contra la de una proteína de referencia, la β -actina utilizando para esto el anticuerpo policlonal de chivo, Santa Cruz, CA, USA® contra β -actina en una dilución 1: 1000 en TBST-

leche al 5% por 2 horas, siguiendo el procedimiento antes descrito para el bloqueo, incubación con anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano, revelado y cuantificación densitométrica de las proteínas.

7.3 Soluciones utilizadas:

- Solución Homogenizadora-Tris-HCl 100 mM, pH 7.4: se disuelven 7.88 g de Tris-HCl (sigma) en 500 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1N.
- Coktail inhibidor de proteasas:
 - PMSF: se disuelven 52.3 mg en 30 ml de DMSO.
 - TLCK: se disuelven 33.23 mg en 1 ml de agua desionizada
 - IAA: se disuelven 6.6 mg en 30 ml de agua desionizada
- Solución TE con SDS: se prepara una solución de Tris-HCl 100 mM, pH 7.4 y se adiciona con EDTA 1 mM y SDS 1%. Se conserva en refrigeración.
- Solución stock de acrilamida: se disuelven 30 g de archilamida y 0.8 g de Bis-acrilamida (N,N'-methylen-bis-acrilamida) en 50 ml de agua desionizada. Se afora a 100 ml y se almacena por 2 semanas a 2-8°C.
- Soluciones de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 y 1.5 M. pH 8.8: se disuelven 6 g de Tris base aforando a 100 ml y ajustando el pH a 6.8 con HCl 1 N. Almacenar a 2-8°C. Para la solución 1.5 M se disuelven 90.75 g aforando en un matraz de 500 ml y ajustando el pH de la misma manera.
- Solución de Persulfato de Amonio al 10 %: Se disuelven 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada. Se conserva en refrigeración.
- Buffer de carga para inmuno Blot: se agrega en un tubo Falcon de 50 ml los reactivos en el siguiente orden:
 1. Agua destilada 4ml
 2. Tris HCl 0.5 M, pH 6.8, 1 ml
 3. SDS 10 %, 0.8 ml
 4. 1.6 ml β -mercaptoetanolse almacena en refrigeración por 2 semanas.

- Solución de TBS, pH 7.6: pesar 12.1 g de Tris base y 40 g de NaCl, ajustando el pH con HCl 1 N y aforar a 5000 ml. Almacenar en refrigeración.
- Tween (TBST): se agrega a 100 ml de TBS, 0.1 ml de Tween 20. Esto debe hacerse con jeringa de insulina ya que es difícil pipetear el Tween.
- Buffer de corrida para inmuno Blot 4X: Se disuelven y aforan a 1 litro: 12.12 g de Tris base, 57.6 g de glicina, 4 g de SDS. Se disuelven primero en 750 ml de agua bidestilada y después se afora a 1L. No ajustar pH y almacenar a 2-8°C.
- Tris Glicina 4X:
- Buffer de transferencia:
 1. Tris-Glicina HCl 10%
 2. Agua desionizada 70%
 3. Metanol 20%

7.4 Inmunoprecipitación para la determinación del heterodímero AT₁/AT₂ en la porción abdominal y torácica de la aorta de rata.

La obtención del tejido se llevó a cabo con la técnica descrita anteriormente, el tejido obtenido se homogenizó a 25'000 RPM en PBS 0.1 M, pH 7.5 con un cóctel de inhibidores de las *proteasas* (PMSF, IAA, TLCK 10µl/ml) a 4°C; y se centrifugó a 3000 RPM por 5 minutos, el sobrenadante se incubó con Disuccinimidil Tartrato (DST) 25mM en Dimetil Sulfóxido (DMSO; 8.6 mg/1ml; 8 µl DST/100 µl de homogenado, concentración final 2 mM)) a 4°C por 2 horas y la reacción se detuvo con 20 µl/ml de Tris 1M, pH7.4 por 15 minutos, se agregó 20 µl de anticuerpo primario contra el receptor AT1 (Policlonal, Santa Cruz, CA, USA ®) en 20 µl de homogenado, incubando a 4°C toda la noche, la captura del inmunocomplejo se hace con 400 µl de proteína A en un tubo de microcentrífuga

Handee™, se centrifuga a 6000 RPM por 1 minuto y se hacen 4 lavados con 400 μ l de wash Buffer, después de esto se agregan los 40 μ l del homogenado más el anticuerpo contra los receptores a Ang II AT₁ (complejo antígeno anticuerpo) y se deja incubando durante 10 minutos, se centrifuga a 6000 RPM por 1 minuto, se hacen 4 lavados con wash Buffer y se agrega el Buffer de elución, se agita el tubo y se deja actuar por 5 minutos; pasado este tiempo se centrifuga teniendo cuidado de poner el filtro en los tubos limpios para recolectar la muestra que se correrá para el Inmuno Blot. La muestra obtenida se hierve durante 5 minutos en 20 μ l de Buffer de carga del Kit de inmunoprecipitación (Pierce, biotechnology ®) y se realiza la técnica de inmunoblot descrita anteriormente incubando con el anticuerpo primario contra AT₂, la presencia de bandas indicó la existencia del heterodímero.

7.5 Estudio de la reactividad vascular en anillos de aorta aislados in vitro.

Para la evaluación de la respuesta vascular se sacrificaron los animales con éter, se realizó una laparotomía toraco-abdominal en la línea media escindiendo la totalidad de la aorta descendente (segmento torácico y abdominal), la cual fue colocada en una solución de Krebs para la remoción de tejido conectivo y graso. Una vez limpia la aorta se dividió en sus segmentos torácico y abdominal tomando como referencia el diafragma y descartando dos segmentos de 5 mm de largo proximales y distales al mismo, ambos segmentos fueron a su vez fragmentados en anillos de 3-4 mm de longitud.

Las preparaciones se mantuvieron en 10 ml de solución de Krebs y burbujeo constante de una mezcla gaseosa que contiene 5% CO₂:95% O₂ a 37°C y a pH 7.4. La solución de Krebs tiene la siguiente concentración (concentraciones mM):

NaCl, 118; KCl, 4.8; KH_2PO_4 , 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5; NaHCO_3 , 25.0; Dextrosa, 11.7 y calcio disódico EDTA, 0.026.

Los anillos se fijaron a la parte inferior de la cámara para órgano aislado (sostenido por ganchos de nicrom) y en la parte superior a transductores de Grass modelo FTO3, acoplados a un sistema de adquisición de datos (BIOPAC Systems, Inc, modelo MP100A) para registrar los cambios en la tensión isométrica. En experimentos previos se hicieron pruebas y se determinó que la tensión ideal era de 3 g, en ambos segmentos de la aorta por lo que los anillos fueron sometidos a ésta tensión.

Cada 30 minutos los anillos se estimularon con una concentración submáxima de fenilefrina (aproximadamente el 80% de la respuesta máxima) y se lavaron con solución de Krebs cada 15 minutos durante 2 horas. En la última estimulación con fenilefrina, los anillos se expusieron a Carbacol, un agonista colinérgico (1×10^{-6} M), para certificar la funcionalidad del endotelio (Furchgott y Zawadski, 1980).

Después de 2 horas de estabilización se realizaron curvas concentración respuesta gradual a concentraciones crecientes de Angiotensina II, de 1×10^{-10} hasta 1×10^{-8} M (se hizo hasta esta concentración para evitar la taquifilaxia de los receptores) en anillos de aorta de ratas embarazadas (días 19-21) y no embarazadas; en cada experimento se utilizaron 6 anillos aórticos de dos ratas embarazadas y 6 anillos aórticos de dos ratas no embarazadas en cualquier fase del ciclo estral; después de la realización de la primera curva se hicieron lavados constantes por media hora con solución de Krebs a 37 °C y los anillos se dividieron en anillos controles y anillos tratados, los cuales se incubaron por 30 minutos con fármacos inhibidores o el vehículo correspondiente; al final de este tiempo se corrieron las curvas nuevamente a Ang II a concentraciones de 1×10^{-10} M hasta $1 \times 10^{-7.5}$ M (se utilizó hasta esta concentración porque se observó un efecto máximo, mientras que ha mayores concentraciones el efecto fue disminuyendo por la taquifilaxia que presentan estos receptores).

Con el fin de evaluar la participación del óxido nítrico, se corrieron curvas en presencia en el baño de perfusión del inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (SON) L- ω -nitro arginina metil ester (L-NAME $1 \times 10^{-4} \text{M}$) (Rees y col.,1990). Para determinar la participación de las prostaglandinas, los anillos aórticos fueron pretratados con indometacina a una concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$ en el baño de perfusión, concentración que ha sido reportada como eficaz para la inhibición de la ciclooxigenasa de manera no selectiva (Rosolowsky M y col., 1990).

8. FÁRMACOS UTILIZADOS

Se prepararon cada una de las siguientes soluciones frescas para cada experimento, fenilefrina (Research Biochemicals Internacional; Natick, MA, USA); carbacol, Angiotensina II, L-NAME e indometacina (Sigma-2000 Aldrich Química, México). Las soluciones “madre” se prepararon en agua bidestilada y las diluciones en solución de Krebs. Se utilizó una solución de carbonato de sodio al 3.5% para disolver la indometacina. Todas las concentraciones de los fármacos se expresan como la concentración molar final en la cámara de órgano aislado.

9. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se incluyeron 4 animales para cada grupo experimental en el caso del Inmuno Blot, 3 animales para cada grupo de la Inmunoprecipitación y 6 animales para cada grupo en la determinación de la reactividad vascular.

- Los resultados se reportan como media \pm EEM.
- La significancia estadística de las diferencias entre medias es evaluada con la prueba “t” de Student para datos no pareados
- Las curvas dosis-respuesta se evaluaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y una prueba de contraste de medias tipo Bonferroni.
- Los valores de concentración efectiva 50 (CE_{50}) o de pD_2 ($-\log [CE_{50}]$) se determinaron con un análisis de regresión no lineal. Dicho análisis usa un modelo sigmoidal para el ajuste de las curvas de concentración-respuesta, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{E_{\max}[A]^m}{[A]^m + [CE_{50}]}$$

Donde E representa el efecto farmacológico y [A] la concentración del agonista. CE_{50} , m y E_{\max} representan los parámetros de localización, pendiente y asíntota, respectivamente.

- En todas las comparaciones, se consideró que valores menores a $p < 0.05$ representaban diferencias significativas.

10. RESULTADOS

10.1 Determinación de la reactividad vascular a Ang II en anillos de aorta torácica y abdominal de ratas NE y embarazadas

Al hacer la comparación pareada de las curvas concentración respuesta a Ang II entre los grupos de ratas embarazadas y NE, se puede observar que existe una disminución de la respuesta contráctil a Ang II tanto en el segmento torácico como en el abdominal, siendo la disminución más marcada en la aorta abdominal (Figura 5). Además se observa que los efectos máximos de las arterias de los animales embarazados fueron menores que los representados por los anillos de aorta de ratas NE, pero la sensibilidad a Ang II no cambia en ambos grupos (Tabla 1)

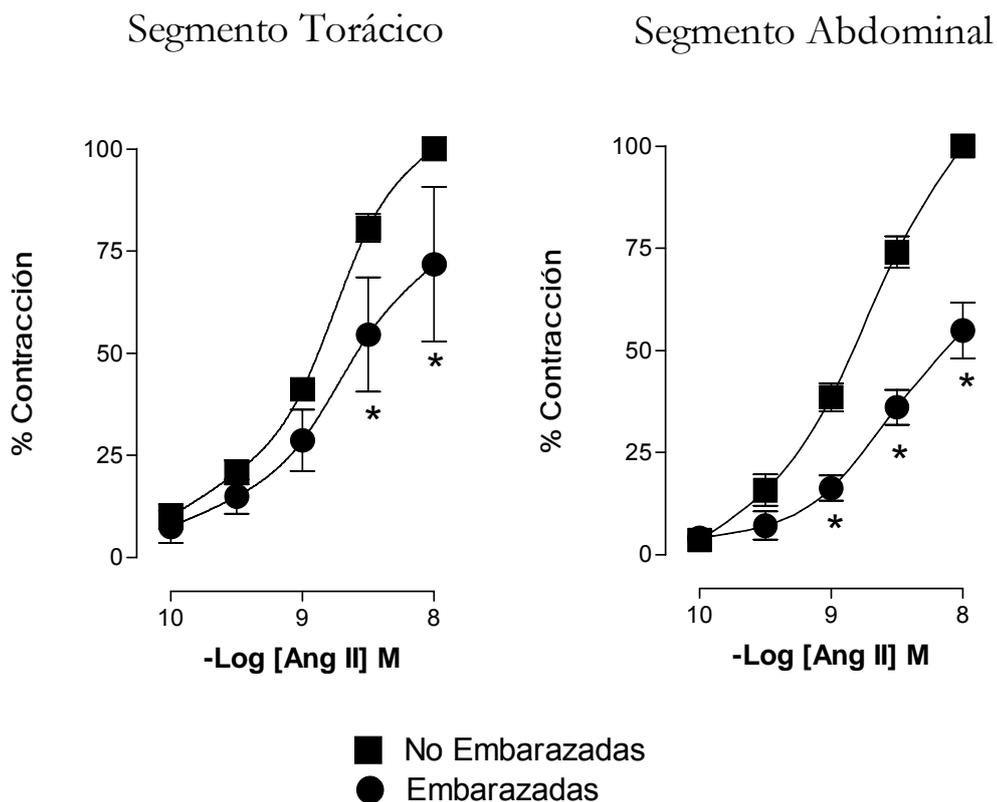


Figura 5. Curvas concentración-respuesta a Ang II en anillos íntegros de aorta del segmento torácico y abdominal de ratas NE y embarazadas. Cada valor representa la media \pm el error estándar de la media de 6 experimentos. * $p < 0.05$

Tabla 1. Valores de Emax (g), y afinidad (PD₂) en la respuesta contráctil a Ang II en el segmento torácico y abdominal de anillos de Aorta de ratas NE y Embarazadas.

Segmento	No Embarazadas		Embarazadas	
	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal
Emax	0.84±0.11	0.99±0.13	0.34±0.04*	0.37±0.06*
pD ₂	8.82±0.06	8.64±0.10	8.77±0.19	8.67±0.12

*p<0.05 vs NE

10.2 Expresión proteica del receptor AT₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas

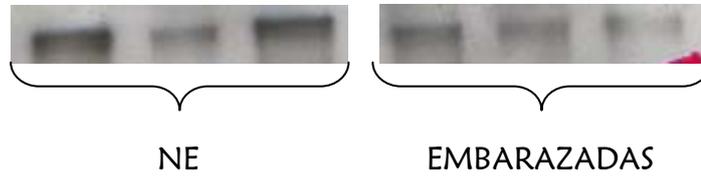


Figura 6. Expresión proteica del receptor AT₁ en aorta torácica

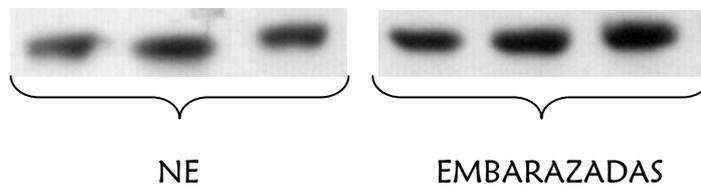


Figura 7. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica

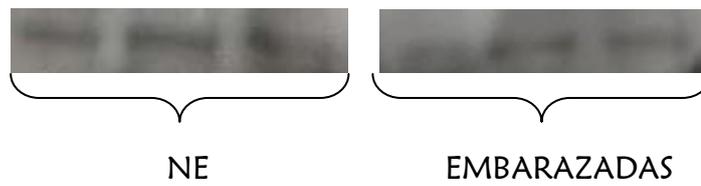


Figura 8. Expresión proteica del receptor AT₁ en aorta abdominal

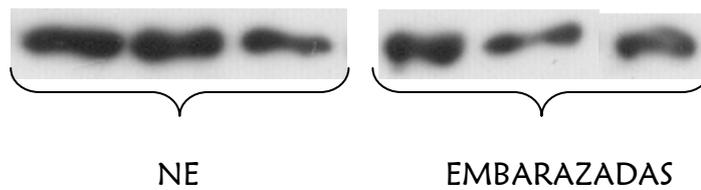


Figura 9. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal

10.3 Determinación de la expresión proteica del receptor AT₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE)

Cuando evaluamos la expresión proteica de los receptores AT₁ a Ang II en aorta de ratas no embarazadas, se demostró que existen cambios en la expresión de estos receptores a lo largo de la aorta, diferenciándose en sus dos segmentos torácico y abdominal.

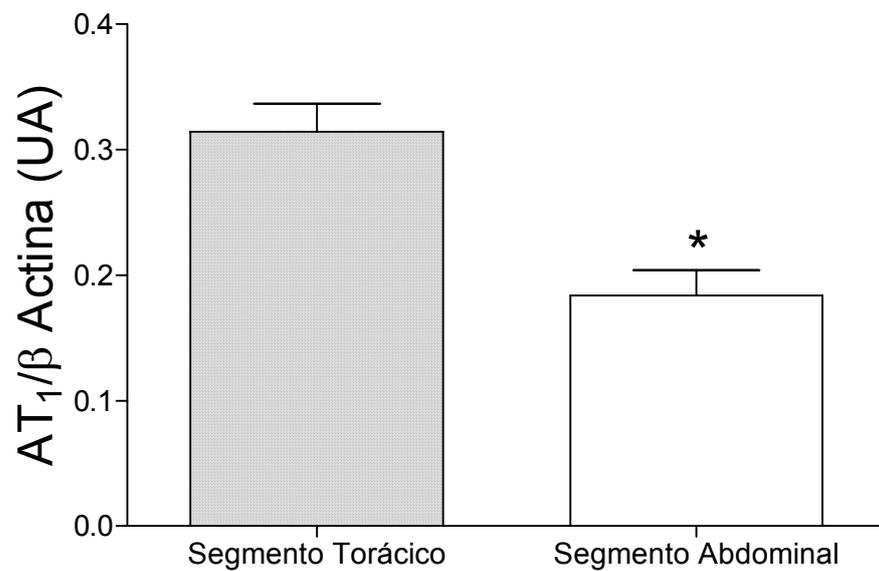


Figura 10. Expresión proteica del receptor AT₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística (*P<0.05) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas NE

10.4 Determinación de la expresión proteica del receptor AT₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas

Cuando evaluamos la expresión proteica de los receptores AT₁ a Ang II en aorta de ratas embarazadas, se demostró que no existen cambios significativos en la expresión de estos receptores a lo largo de la aorta.

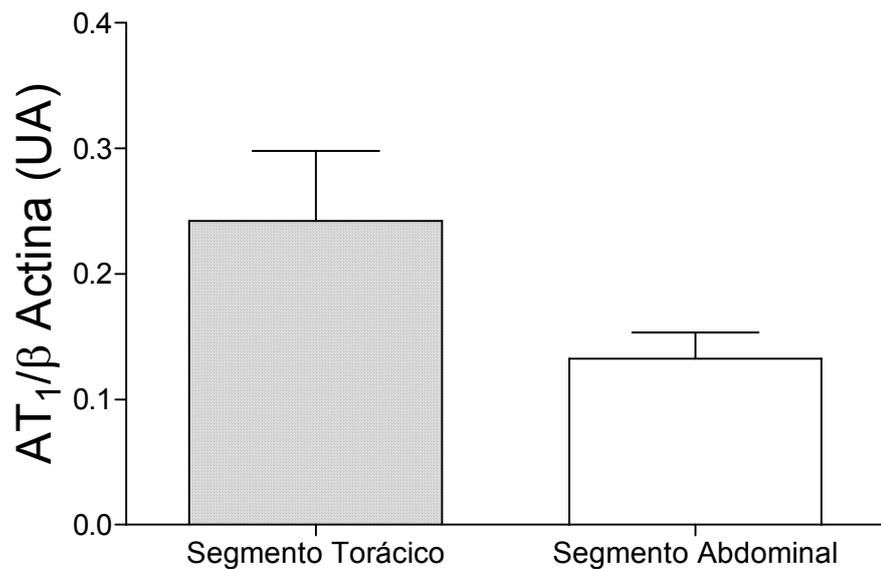


Figura 11. Expresión proteica del receptor AT₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística (*P<0.05) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas.

Al comparar el efecto del embarazo sobre los receptores AT₁ a Ang II a lo largo de la aorta se observó que no modifica la expresión de estos receptores de manera significativa al compararlos con los datos de las ratas NE.

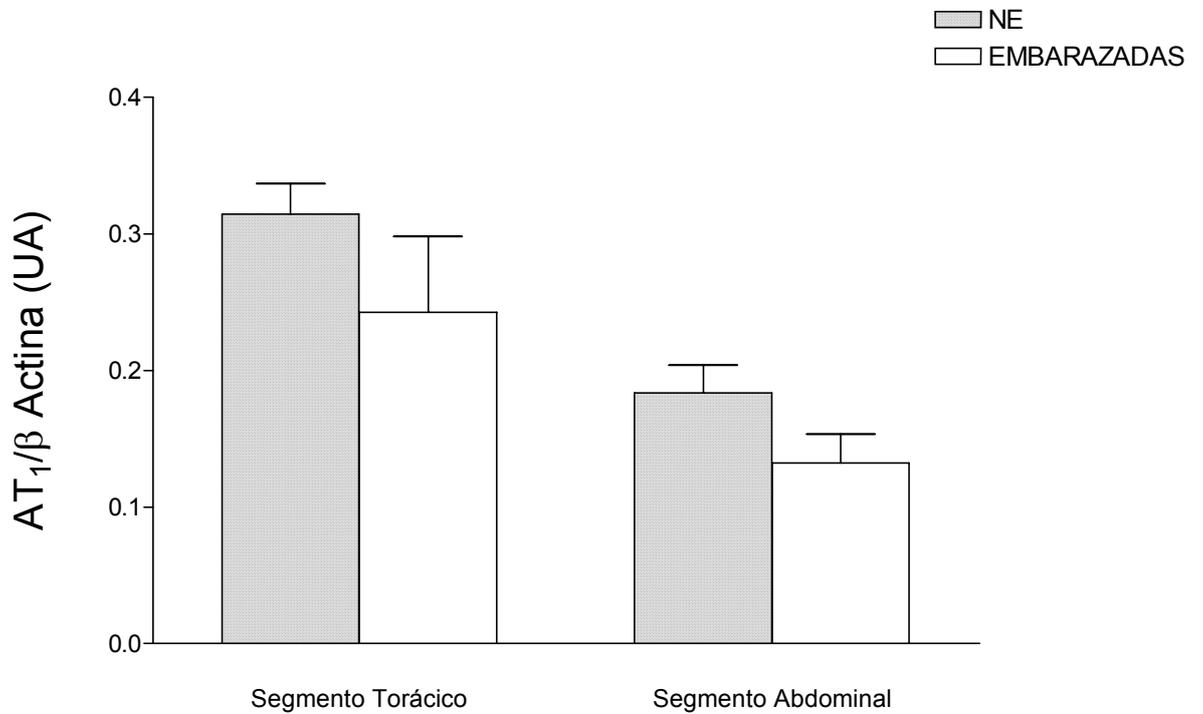


Figura 12. Expresión proteica del receptor AT₁ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos.

10.5 Expresión proteica del receptor AT₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas

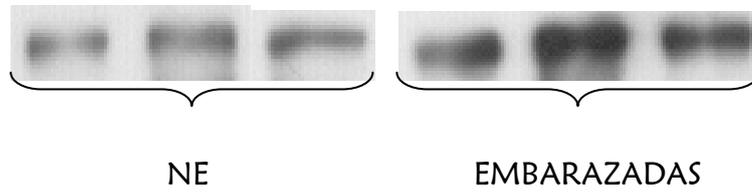


Figura 13. Expresión proteica del receptor AT₂ en aorta torácica

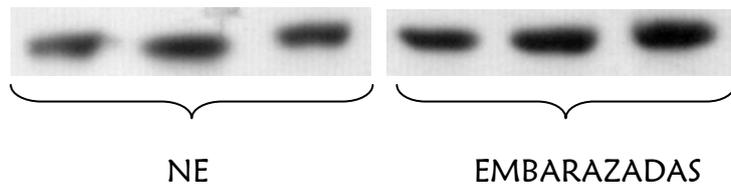


Figura 14. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica

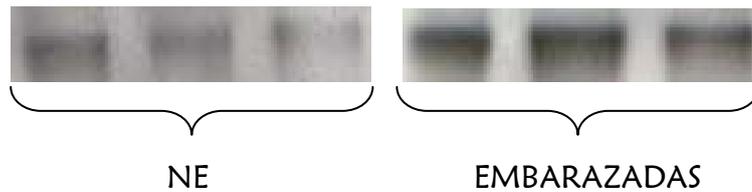


Figura 15. Expresión proteica del receptor AT₂ en aorta abdominal

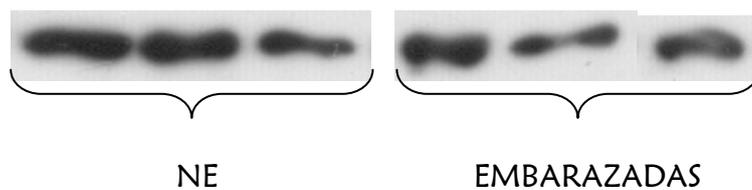


Figura 16. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal

10.6 Determinación de la expresión proteica del receptor AT₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE)

Cuando evaluamos la expresión proteica de los receptores AT₂ a Ang II en aorta de ratas no embarazadas, se demostró que existen cambios en la expresión de estos receptores a lo largo de la aorta, diferenciándose en sus dos segmentos torácico y abdominal.

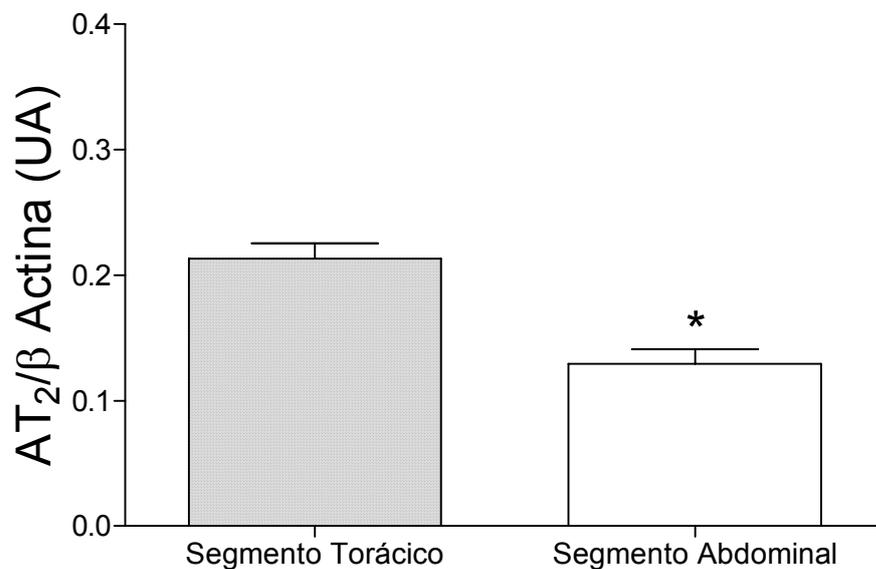


Figura 17. Expresión proteica del receptor AT₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística (*P<0.05) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas NE.

10.7 Determinación de la expresión proteica del receptor AT₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas

Al evaluar la expresión proteica de los receptores AT₂ a Ang II en aorta de ratas embarazadas, se demostró que existen cambios en la expresión de estos receptores a lo largo de la aorta, diferenciándose en sus dos segmentos torácico y abdominal.

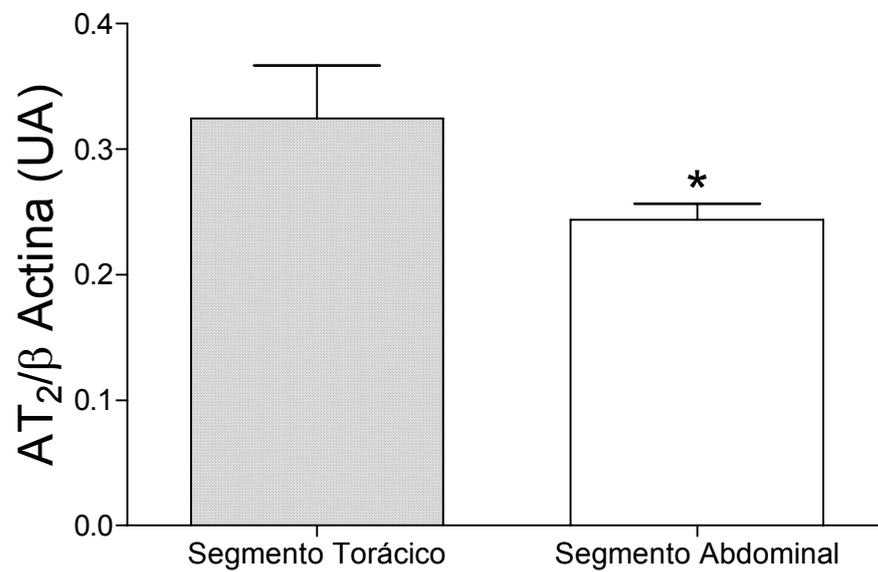


Figura 18. Expresión proteica del receptor AT₂ a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística (*P<0.05) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas.

En la expresión proteica del receptor AT_2 a Ang II se demostró que existe un aumento en la densidad de receptores AT_2 durante el embarazo en comparación con los resultados de la expresión proteica en la aorta tanto torácica como abdominal de ratas no embarazadas.

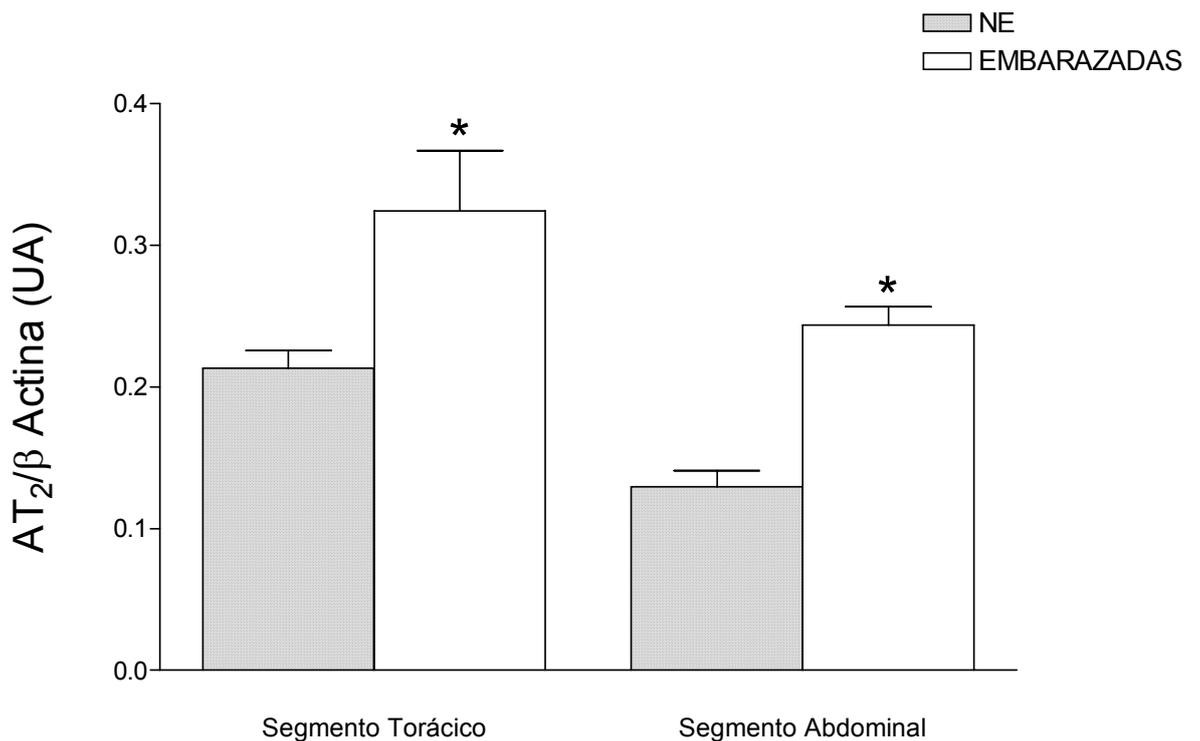


Figura 19. Expresión proteica del receptor AT_2 a Ang II en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos. * $P<0.05$ vs NE

10.8 Evaluación de la participación del ON en la reactividad vascular a Ang II en anillos de aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE

Para investigar la participación del óxido nítrico en respuesta a la Ang II, se midió la contracción de los anillos de aorta en ausencia y presencia de L-NAME, donde se observa que en los anillos de aorta torácica de ratas no embarazadas el efecto máximo a Ang II fue mayor al inhibir la síntesis de ON, mientras que en los animales preñados no hay cambios (Figura 25, Tabla 2). Tampoco se encontraron cambios en los anillos de aorta abdominal de ratas embarazadas y NE (Figura 26, Tabla 2).

ANILLOS DE AORTA TORÁCICA

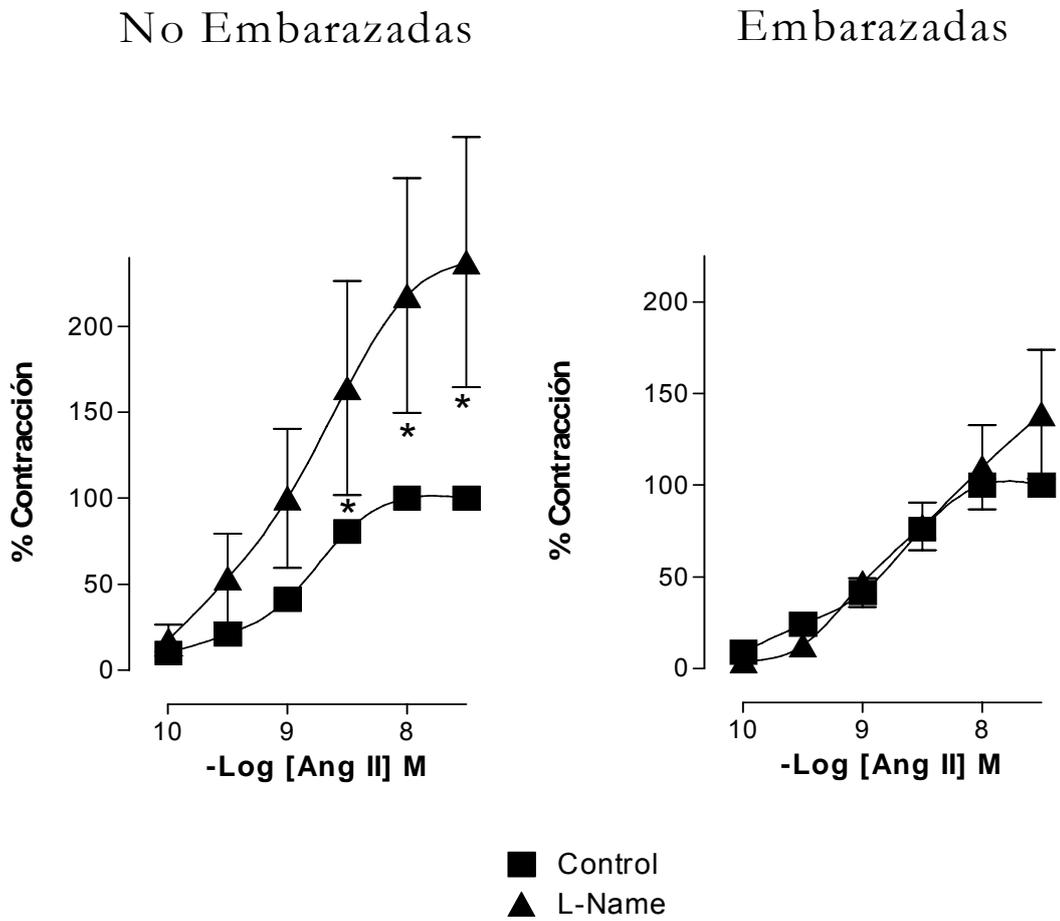


Figura 20. Efecto de la inhibición de ON con L-NAME [10^{-4} M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta torácica de ratas NE y embarazadas. Cada punto representa la media \pm el error estándar de la media de $n=6$ experimentos. * $p < 0.05$

ANILLOS DE AORTA ABDOMINAL

No Embarazadas

Embarazadas

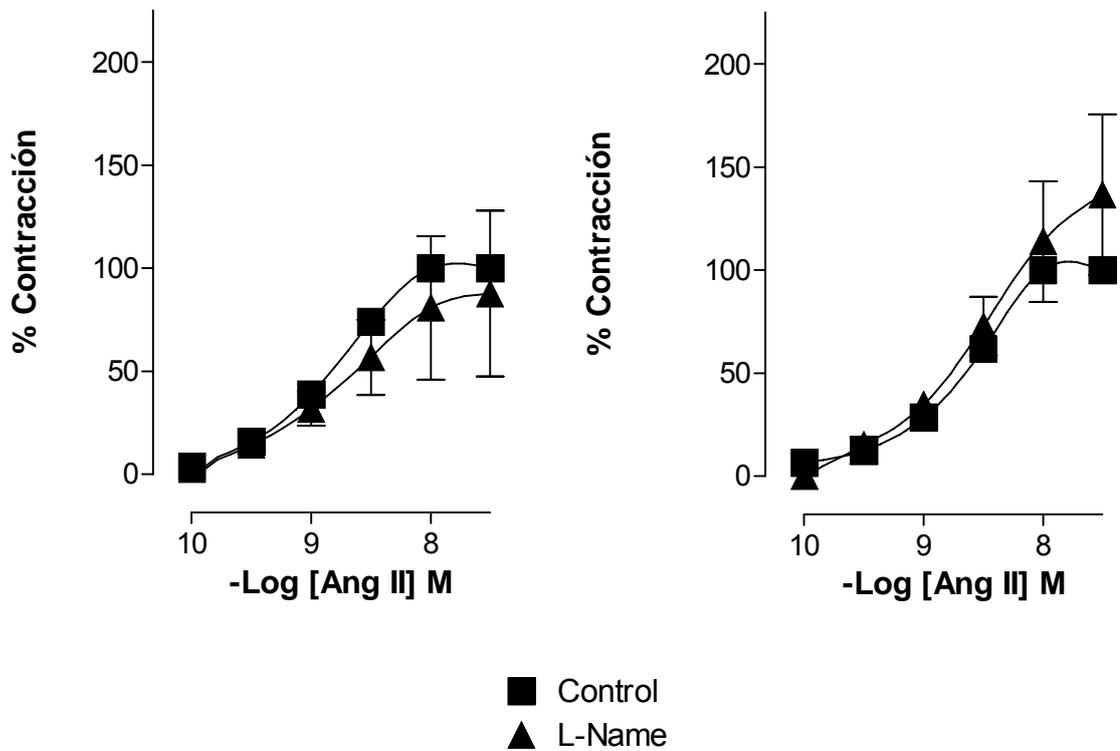


Figura 21. Efecto de la inhibición de ON con L-NAME [10^{-4} M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta abdominal de ratas NE y embarazadas. Cada punto representa la media \pm el error estándar de la media de $n=6$ experimentos. * $p<0.05$

Tabla 2 Valores de Emax (g), y afinidad (PD₂) en la respuesta contráctil a Ang II en el **segmento torácico y abdominal** de anillos de Aorta de ratas NE y Embarazadas en presencia y ausencia de **L-NAME [10⁻⁴M]**.

Segmento	Control		No Embarazadas		Control		Embarazadas	
	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal
Emax	0.76±0.33	0.75±0.20	1.61±0.49*	0.66±0.30	0.39±0.09	0.45±0.16	0.64±0.18	0.80±0.22
pD ₂	8.89±0.14	8.60±0.05	8.74±0.18	9.00±0.19	8.97±0.29	8.46±0.28	8.44±0.32	8.57±0.28

*p<0.05 vs control

10.9 Expresión proteica de la isoenzima NOSe en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas



Figura 22. Expresión proteica de la enzima NOSe en aorta torácica

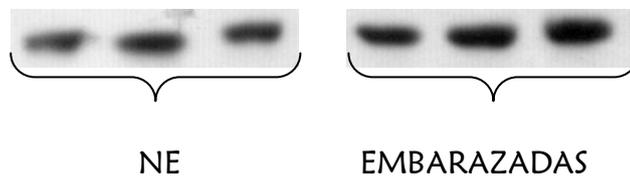


Figura 23. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica

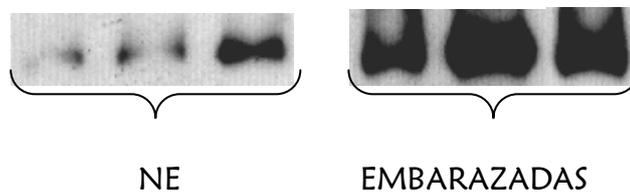


Figura 24. Expresión proteica de la enzima NOSe en aorta abdominal

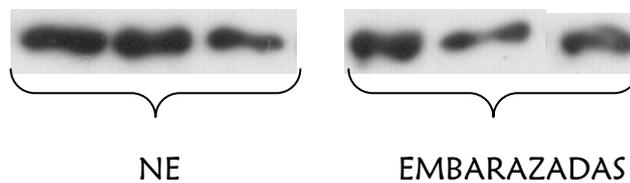


Figura 25. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal

10.10 Determinación de la expresión proteica de la SONE en aorta torácica y abdominal de ratas NE

En la determinación de la expresión proteica de la enzima SONE en aorta de ratas NE, se puede distinguir que no se existen cambios en la expresión de esta enzima a lo largo de la aorta.

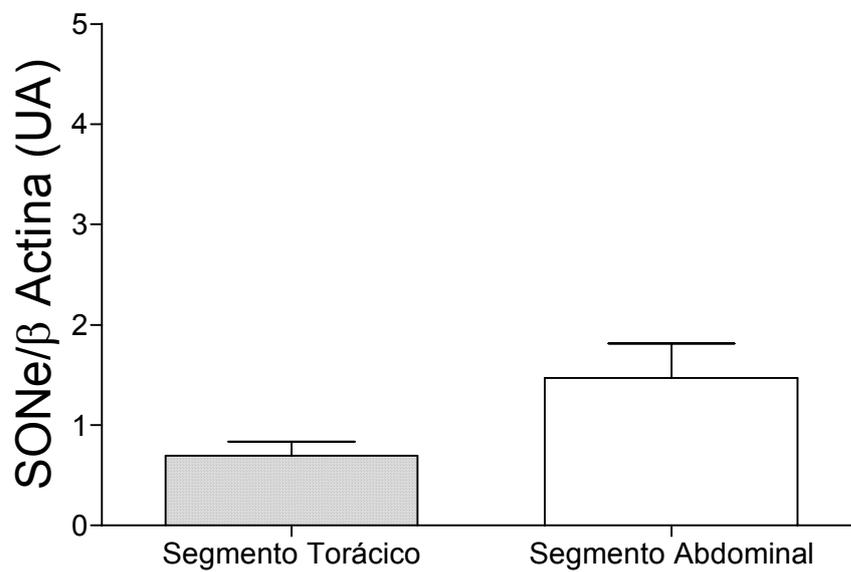


Figura 26. Expresión proteica de la SONE en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos.

10.11 Determinación de la expresión proteica de la SONE en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas

Al comparar la expresión proteica de la isoenzima SONE en los segmentos torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas, se puede advertir que existe una diferencia en la expresión de esta enzima entre ambos segmentos de la aorta, notando que existe una mayor proporción en la aorta abdominal.

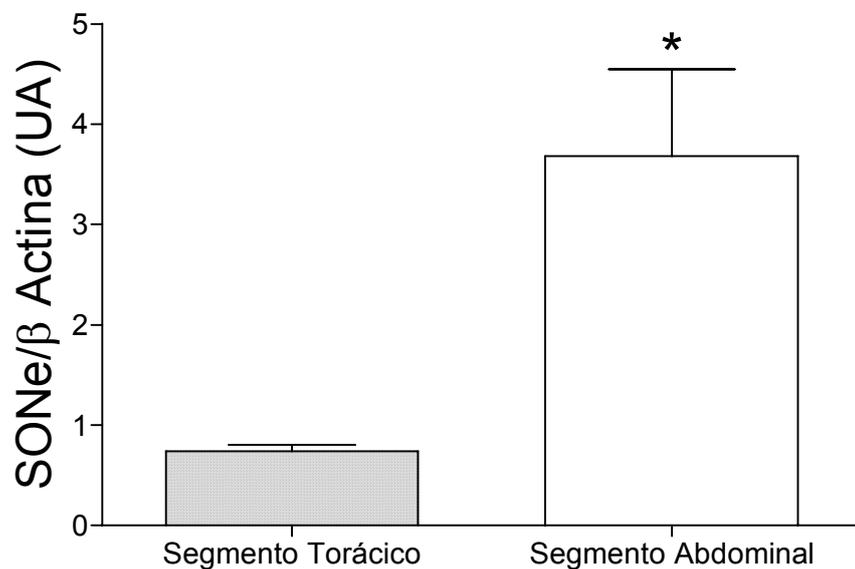


Figura 27. Expresión proteica de la isoenzima SONE en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística ($*P<0.05$) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas.

En la comparación de la expresión proteica de la SONE en ambos segmentos de la aorta tanto de ratas NE como embarazadas se demostró que existe un aumento en la expresión de la SONE durante el embarazo en el segmento abdominal, mientras que en el segmento torácico no se observan cambios significativos.

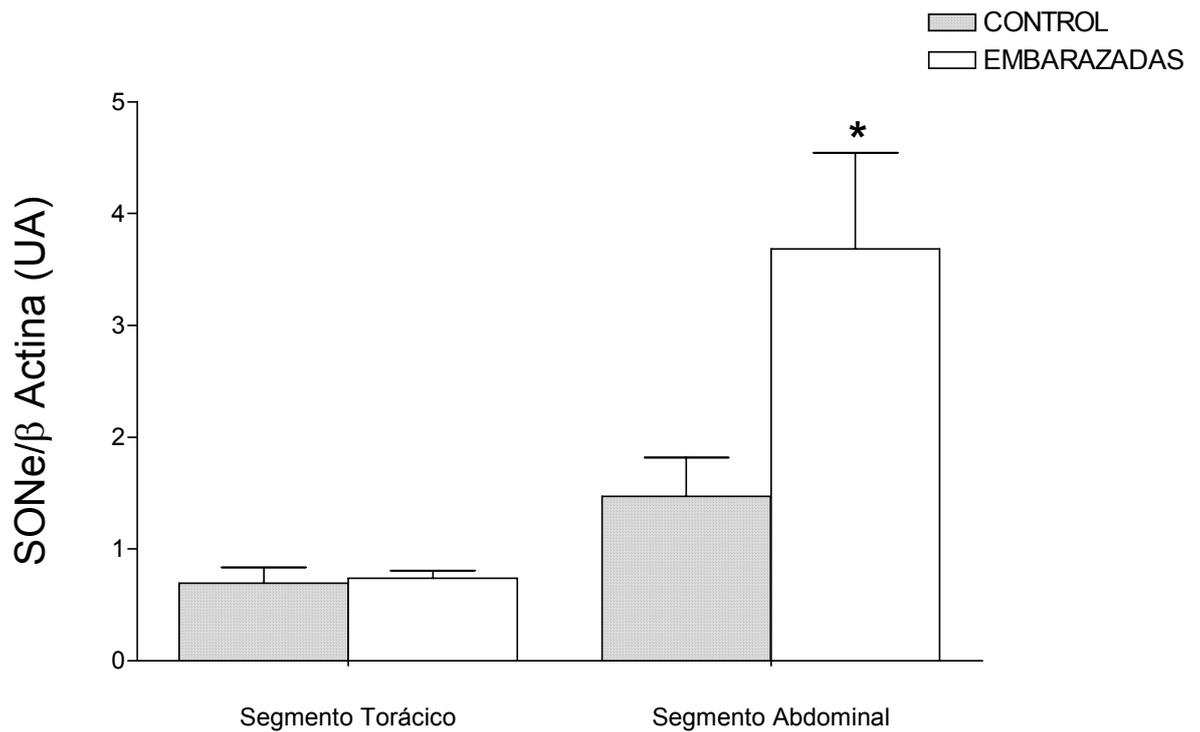


Figura 28. Expresión proteica de la enzima SONE en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. *P<0.05 vs NE

10.12 Evaluación de la participación de las prostaglandinas en la reactividad vascular a Ang II en anillos de aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE

Para evaluar la participación de las prostaglandinas en la respuesta contráctil a Ang II, se realizaron las curvas de reactividad vascular en ausencia y presencia de indometacina [$10^{-5}M$] para inhibir de manera no selectiva a las isoformas de la COX en los anillos de aorta torácica y abdominal de ratas NE y embarazadas. En la aorta torácica de ratas NE se observa una disminución de la sensibilidad a la respuesta contráctil a Ang II así como una disminución del efecto máximo comparado con el control (Figura 29, tabla 3), mientras que en el segmento abdominal de la aorta no se observa una disminución del efecto máximo de manera significativa; sin embargo, se puede observar que el efecto máximo durante el embarazo en presencia de indometacina disminuye de manera considerable en la aorta abdominal de las ratas, además también hay una disminución de la afinidad en esta porción de la aorta ya que el PD_2 decrece de manera significativa (Figura 30, Tabla 3).

ANILLOS DE AORTA TORÁCICA

No Embarazadas

Embarazadas

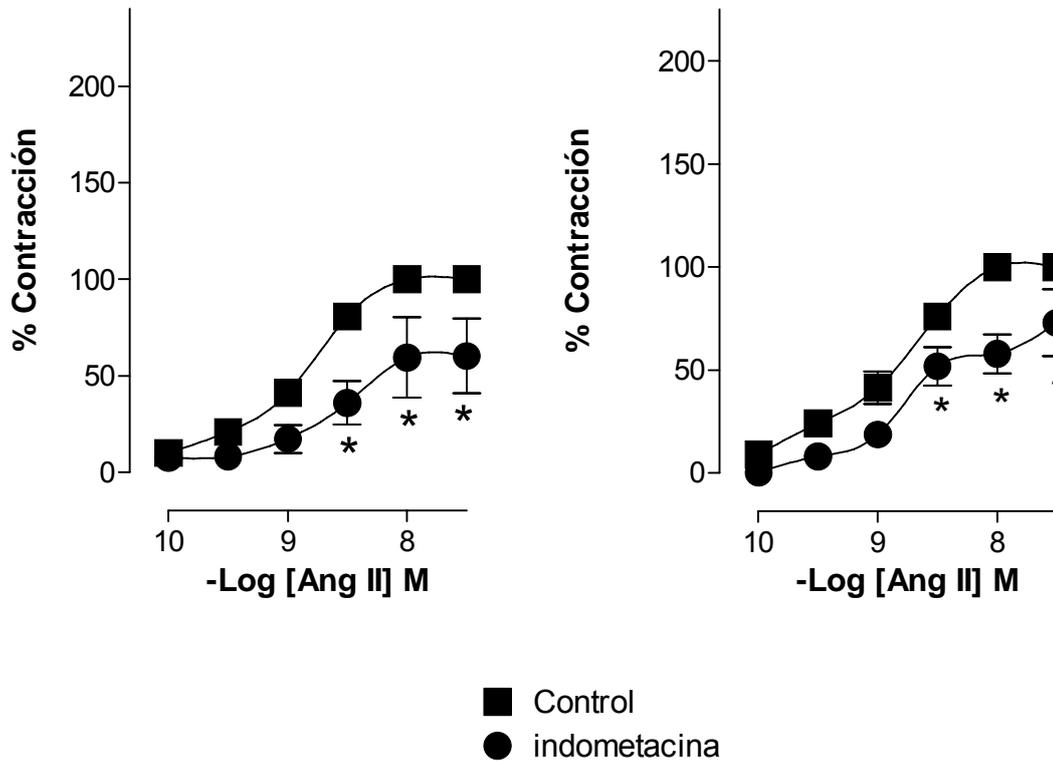


Figura 29. Efecto de la inhibición de prostaglandinas con indometacina [10^{-5} M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta torácica de ratas NE y embarazadas. Cada punto representa la media \pm el error estándar de la media de $n=6$ experimentos. $*p<0.05$

ANILLOS DE AORTA ABDOMINAL

No Embarazadas

Embarazadas

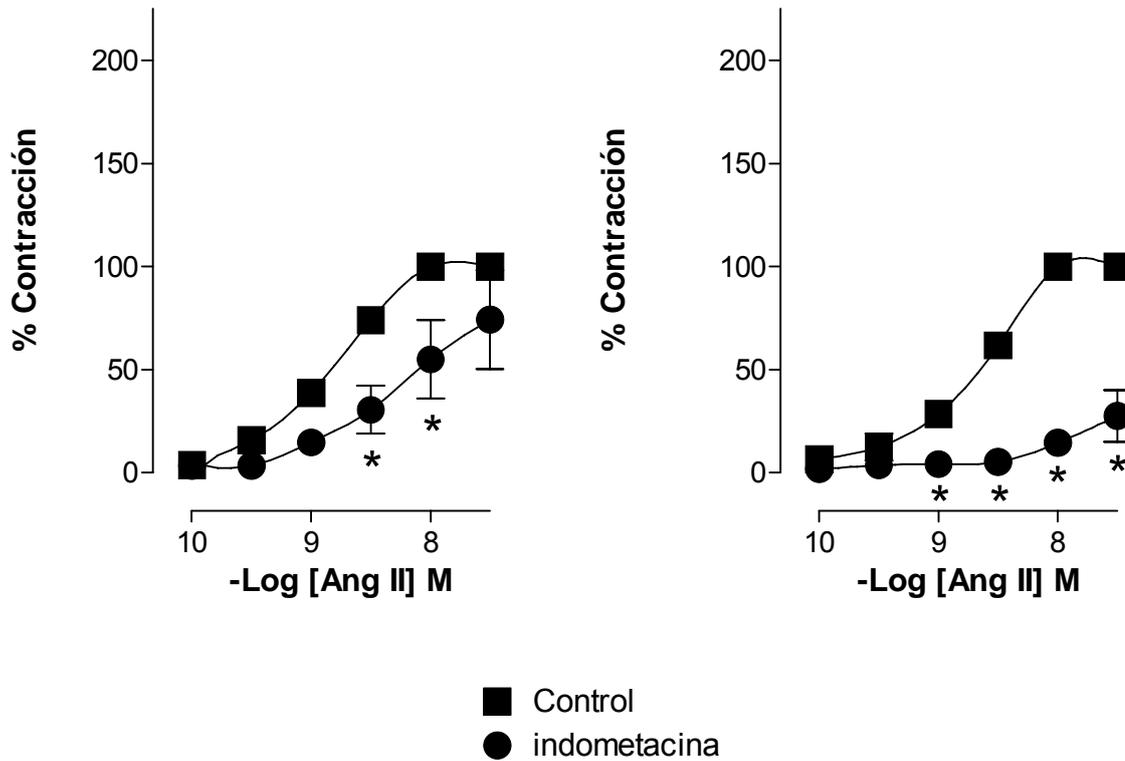


Figura 30. Efecto de la inhibición de prostaglandinas con indometacina [10^{-5} M] en la contracción inducida por Ang II en anillos aislados de aorta abdominal de ratas NE y embarazadas. Cada punto representa la media \pm el error estándar de la media de n=6 experimentos. *p<0.05

Tabla 3. Valores de Emax (g), y afinidad (PD₂) en la respuesta contráctil a Ang II en el **segmento torácico y abdominal** en anillos de Aorta de ratas NE y Embarazadas en presencia y ausencia de **Indometacina [10⁻⁵M]**.

Segmento	Control		No Embarazadas		Control		Embarazadas	
	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal	Torácico	Abdominal
Emax	0.76±0.33	0.75±0.02	0.34±0.13*	0.56±0.08	0.41±0.04	0.45±0.16	0.32±0.03*	0.19±0.08*
pD ₂	8.89±0.14	8.60±0.05	8.42±0.22	8.36±0.19	8.97±0.29	8.46±0.28	8.45±0.27	7.69±0.27*

*p<0.05 vs control

10.13 Expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas

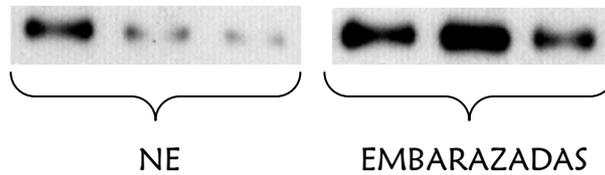


Figura 31. Expresión proteica de la enzima COX-1 en aorta torácica

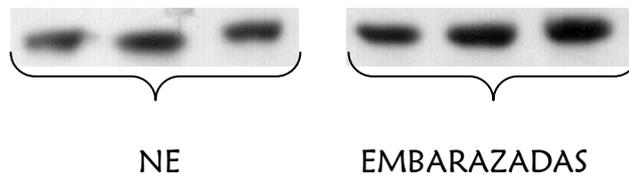


Figura 32. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica

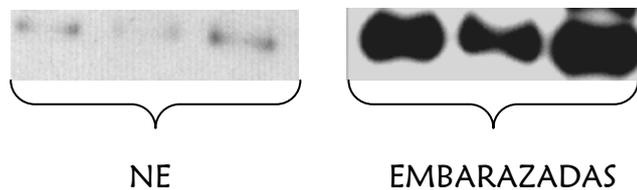


Figura 33. Expresión proteica de la enzima COX-1 en aorta abdominal

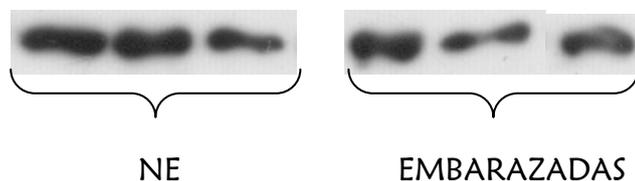


Figura 34. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal

10.14 Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE)

Al evaluar la expresión proteica de la enzima COX-1 en aorta de ratas no embarazadas, no se encontraron cambios en la expresión de esta enzima a lo largo de la aorta.

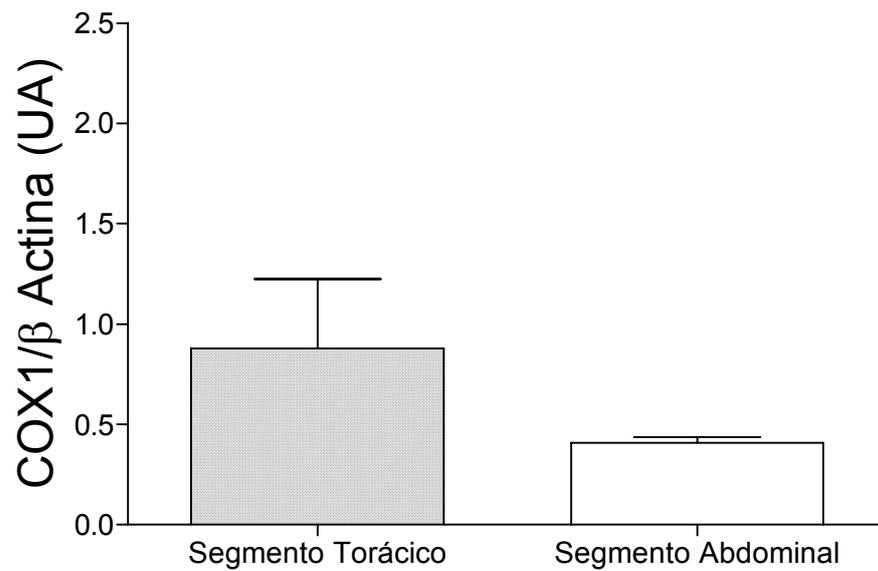


Figura 35. Expresión proteica de la COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos.

10.15 Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas

El medir la expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta de ratas embarazadas, se encontró que existe una diferencia en la expresión de esta enzima entre ambos segmentos de la aorta, observando que en la aorta abdominal la densidad de ésta enzima es mayor.

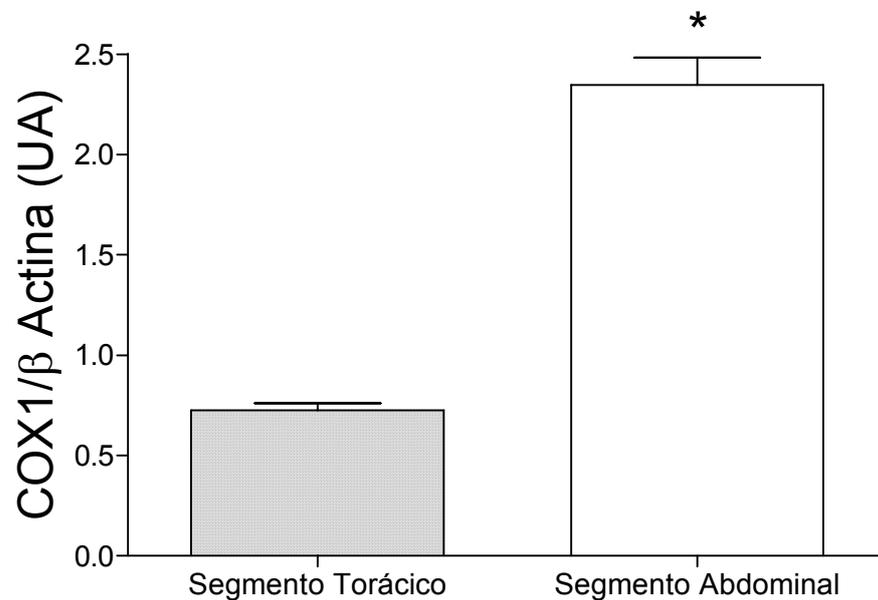


Figura 36. Expresión proteica de la isoenzima COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística ($*P<0.05$) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas.

Al comparar la expresión proteica de la COX-1 en ambos segmentos de la aorta tanto de ratas NE como embarazadas se demostró que existe un aumento en la expresión de la COX-1 durante el embarazo en el segmento abdominal, mientras que en el segmento torácico no se observan cambios significativos.

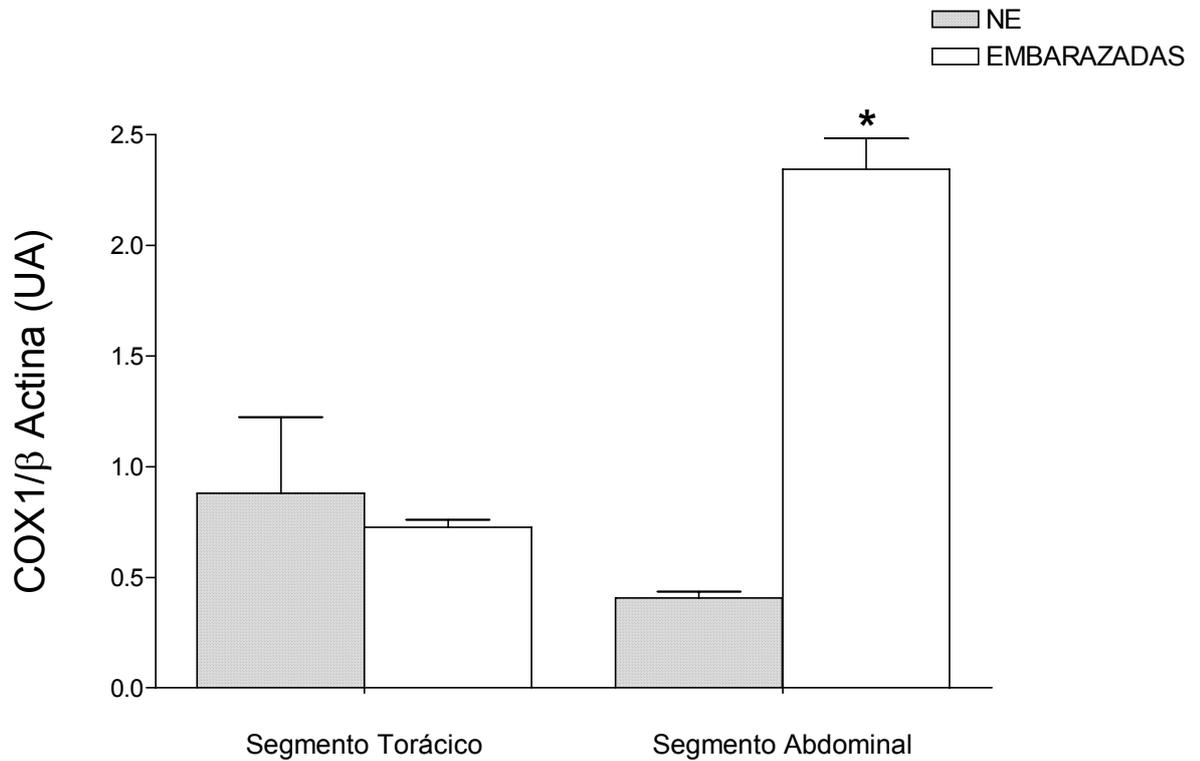


Figura 37. Expresión proteica de la COX-1 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. *P<0.05 vs NE

10.16 Expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas (NE) y embarazadas

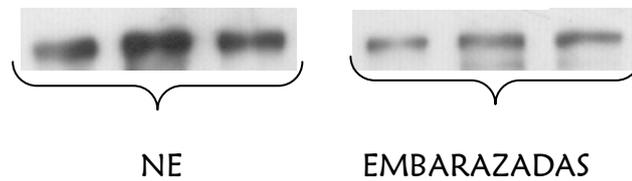


Figura 38. Expresión proteica de la enzima COX-2 en aorta torácica

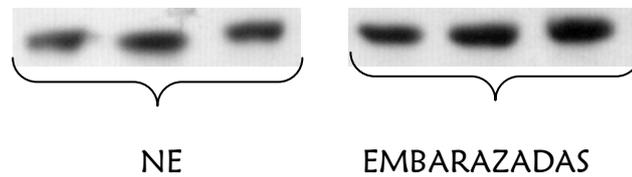


Figura 39. Expresión proteica de β -actina en aorta torácica

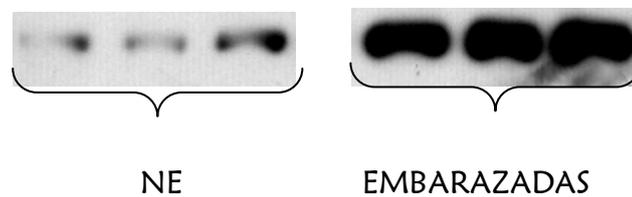


Figura 40. Expresión proteica de la enzima COX-2 en aorta abdominal

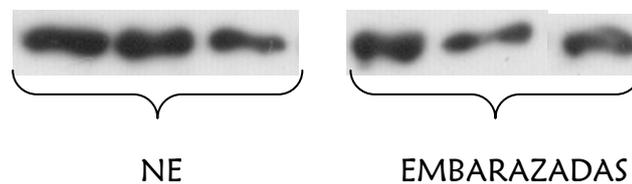


Figura 41. Expresión proteica de β -actina en aorta abdominal

10.17 Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas NE

Al evaluar la expresión proteica de la enzima COX-2 en aorta de ratas NE, no se presentaron cambios en la expresión de esta enzima en todo lo largo de la aorta.

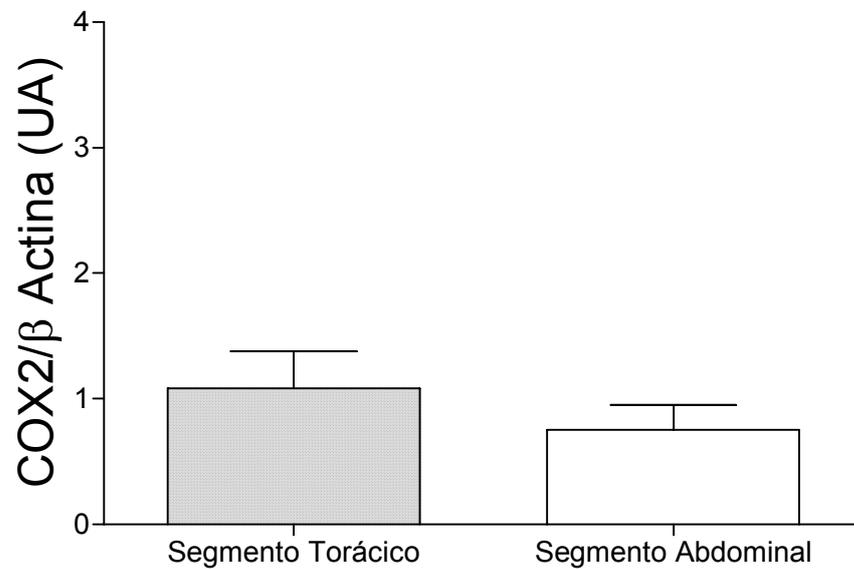


Figura 42. Expresión proteica de la COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos.

10.18 Determinación de la expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas

En la medición de la expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta de ratas embarazadas, se encontró que existe una diferencia en la expresión de esta enzima entre ambos segmentos de la aorta, encontrándose que se encuentra una mayor proporción en la aorta abdominal.

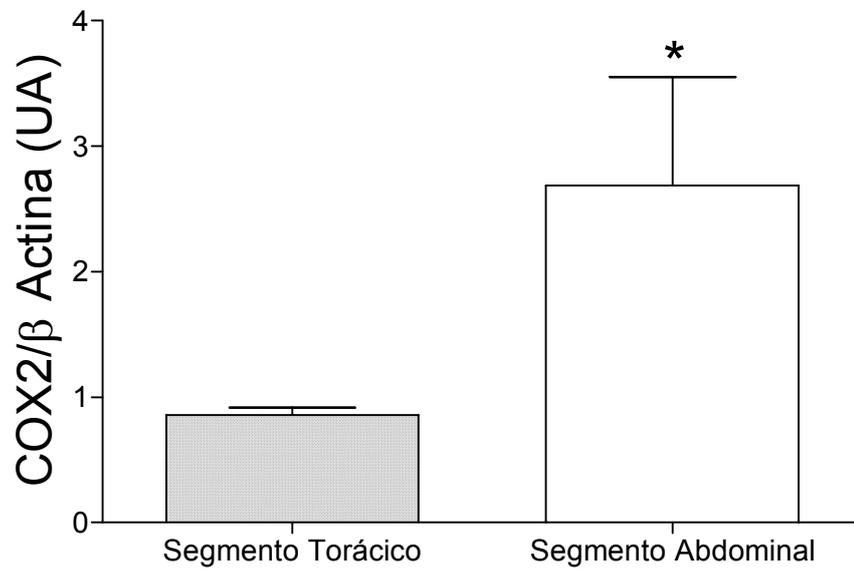


Figura 43. Expresión proteica de la isoenzima COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística ($*P<0.05$) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas.

En la comparación de la expresión proteica de la COX-2 en ambos segmentos de la aorta tanto de ratas NE como embarazadas se demostró que existe un aumento en la expresión de la COX-2 durante el embarazo en el segmento abdominal, mientras que en el segmento torácico de la aorta no se observan cambios significativos.

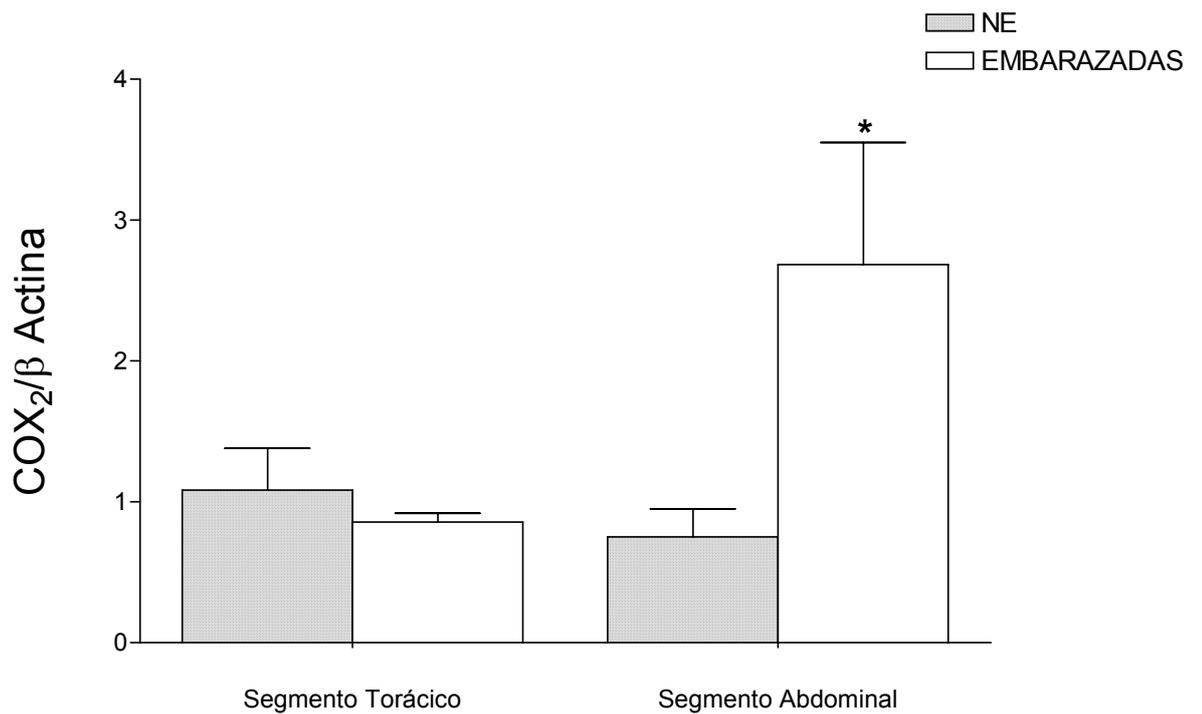


Figura 44. Expresión proteica de la COX-2 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. *P<0.05 vs NE

10.19 Determinación de la expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta torácica y abdominal de ratas NE y Embarazadas

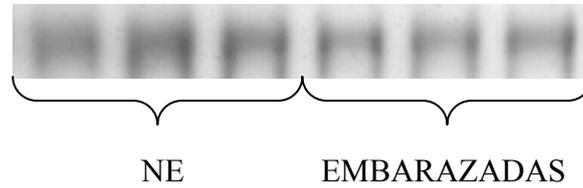


Figura 45. Expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta torácica

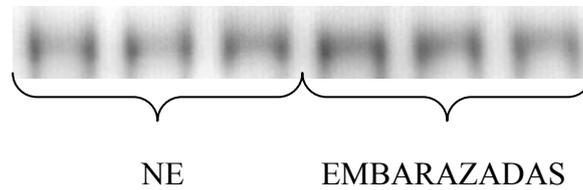


Figura 46. Expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta abdominal

10.20 Determinación de la expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta torácica y abdominal de ratas NE

Al evaluar la expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta de ratas NE, se demostró que existen cambios en la expresión de estos receptores a lo largo de la aorta, encontrando una menor cantidad en la densidad de heterodímero AT₁/AT₂ en el segmento abdominal en comparación con el segmento torácico.

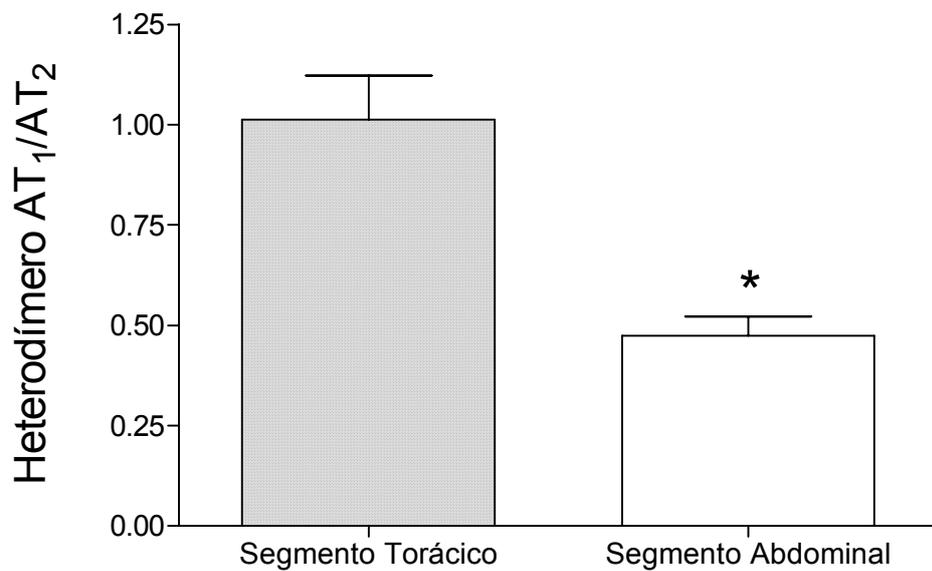


Figura 47. Expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta torácica y abdominal de ratas no embarazadas. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística (*P<0.05) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas no embarazadas.

10.21 Determinación de la expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas

En la evaluación de la expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta de ratas embarazadas, se demostró que existen cambios en la expresión de estos receptores a lo largo de la aorta, encontrando una mayor densidad en la expresión del heterodímero AT₁/AT₂ en el segmento abdominal en comparación con el segmento torácico.

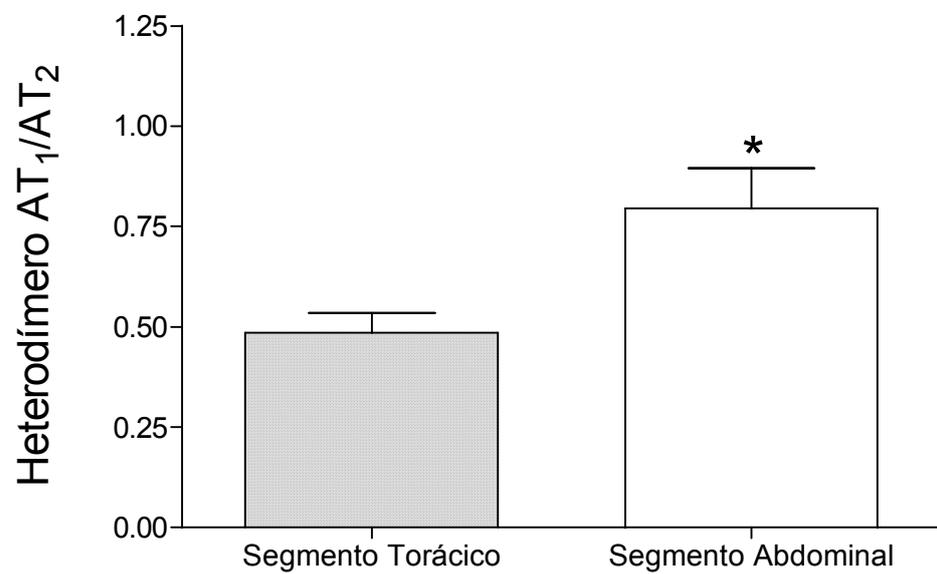


Figura 48. Expresión proteica del heterodímero AT₁/AT₂ en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas. Cada barra representa la media ± el error estándar de la media de al menos n=3 experimentos. El asterisco indica el nivel de significancia estadística (*P<0.05) para las diferencias entre los valores encontrados entre el segmento torácico y abdominal de aorta de ratas embarazadas.

Al comparar la expresión proteica del heterodímero AT_1/AT_2 en ambos segmentos de la aorta tanto de ratas NE como embarazadas se demostró que existe un aumento en la formación del mismo durante el embarazo en el segmento abdominal, mientras que en el segmento torácico la densidad de heterodímero AT_1/AT_2 disminuyó de manera significativa.

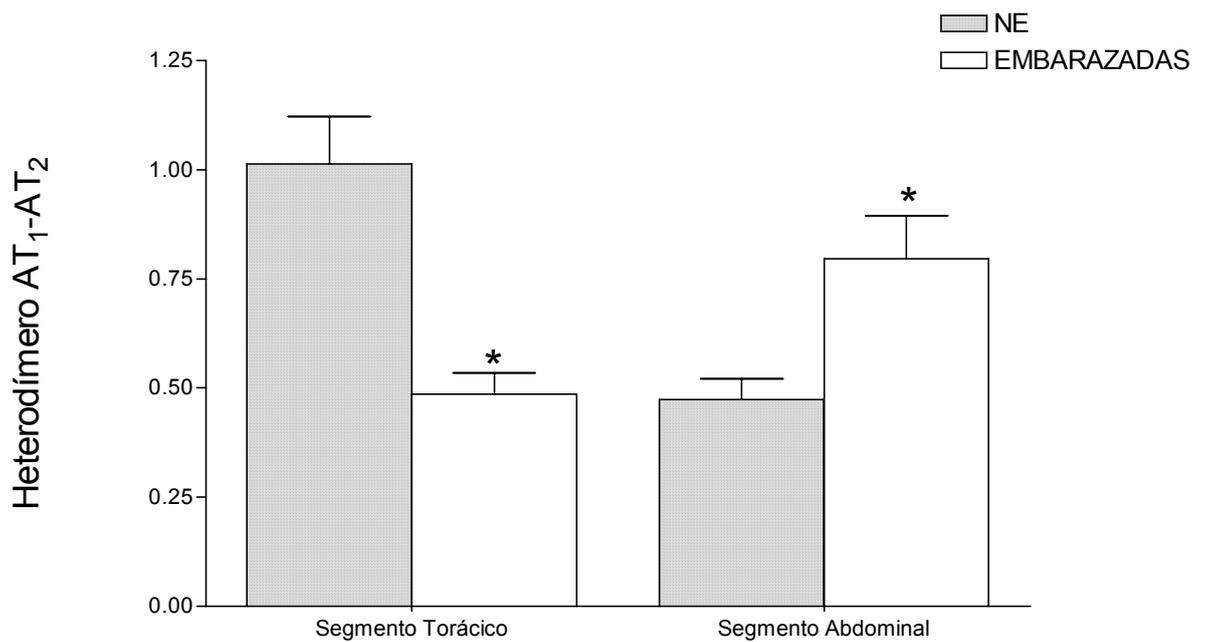


Figura 49. Expresión proteica del heterodímero AT_1/AT_2 en aorta torácica y abdominal de ratas embarazadas y NE. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media de al menos $n=3$ experimentos. * $P<0.05$ vs NE

11. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que durante el embarazo existe una respuesta contráctil disminuida a angiotensina II en la tercera semana de embarazo y que esta respuesta es más evidente en el segmento abdominal. Por otro lado, al comparar la respuesta a Ang II entre los dos segmentos, no se observan diferencias significativas de los Em_{\max} y PD_2 en la aorta (Fig. 5, Tabla 1), ni en preparaciones provenientes de ratas no embarazadas ni de embarazadas, por lo que, al parecer, la estimulación con Ang II no pone de manifiesto diferencias en los mecanismos contráctiles intrínsecos entre los dos segmentos de la aorta. Estos resultados coinciden con lo descritos en la respuesta contráctil de la aorta a diferentes vasoconstrictores α_1 -adrenérgicos, en los dos segmentos de la misma (Bobadilla RA., 1997), indicando que la influencia de la gestación no es selectiva en cuanto a la región del vaso sanguíneo, sin embargo esto no descarta la probabilidad de que exista una variación en la respuesta al comparar dos vasos sanguíneos de diferentes lechos. De esta manera, Weiner y cols. (1992) encontraron evidencias de atenuación en la respuesta a vasoconstrictores en la arteria uterina pero no en la carótida de cobayos gestantes. Según este autor, estas diferencias pueden explicarse en función del aumento considerable de la demanda de flujo sanguíneo en el territorio feto-placentario por lo que se podría pensar que en el segmento abdominal de la aorta la influencia del embarazo es más evidente. Si este razonamiento pudiera aplicarse a diferentes segmentos de un mismo vaso, dado que el segmento abdominal de la aorta se encuentra más cercano al territorio uterino y a la unidad feto-placentaria en el caso de embarazo, podría explicar la respuesta contráctil menor a la Ang II de este segmento aórtico. Sin embargo, de acuerdo a los resultados expuestos en este trabajo, no parece ser así. Esto pudiera deberse a que en este estudio se analizan segmentos de un mismo vaso y no de diferentes lechos vasculares como en el caso de Weiner. Además, la arteria aorta no es un vaso de resistencia y por lo tanto no participa de manera directa en la irrigación uterina ni de otro órgano.

Al medir la expresión proteica de los receptores a Ang II se observa que el embarazo no modifica la expresión de los receptores AT₁ en un mismo segmento (Fig. 12), sin embargo encontramos diferencias al comparar segmentos diferentes. En ratas no embarazadas, los receptores AT₁ se expresaron en menor cantidad ($p < 0.05$) en el segmento abdominal de la aorta comparado con el segmento torácico (Fig. 10), y esta diferencia regional no se modifica con el embarazo (Fig. 11). Se conoce que los receptores AT₁ median los efectos contráctiles de la Ang II y el no haber observado cambios en la expresión de estos receptores durante el embarazo, podría sugerir que la atenuación de la respuesta contráctil a Ang II no esta mediada, de manera directa, por los receptores AT₁.

En la medición de la expresión proteica de los receptores AT₂ se muestra que existen diferencias regionales, tanto en aorta de ratas embarazadas como no embarazadas, pues encontramos que en el segmento abdominal de la aorta existe una disminución significativa de estos comparado con el torácico (Fig. 17, 18). Además, durante el embarazo los receptores AT₂ se expresan en mayor cantidad ($p < 0.05$) en ambos segmentos de la aorta (Fig. 19). A este receptor se le atribuye el antagonismo de los efectos del AT₁, por lo que se deduce que al aumentar durante el embarazo provocaría una disminución de la respuesta contráctil a Ang II, coincidiendo con lo expuesto por St-Louis J. y col. (2001), donde demuestran que la respuesta contráctil a Ang II en arteria uterina arcuata de rata está mediada por los receptores AT₁, y que durante el embarazo la estimulación del receptor AT₂ interfiere con la respuesta a éste péptido. Ellos demostraron que al bloquear al AT₂ el efecto contráctil de la Ang II se potencializaba. Estos resultados sugieren que los subtipos de receptores a Ang II se modulan mutuamente durante el embarazo y el postparto. Además, proporcionan evidencias de que la estimulación de los receptores AT₂ por Ang II interfiere a su vez con la estimulación de los receptores AT₁ en los microvasos uterinos (St-Louis y col. 1997). De acuerdo con el trabajo de Zwart y col. (1998), los efectos de la Ang II en la vasculatura uterina están mediados por el receptor AT₁. Por otro lado, se ha reportado que la unión de Ang II a sitios específicos (al parecer receptores AT₂), aumenta durante el embarazo en la arteria uterina de ovejas (Burell JH y col., 1997), lo que sugiere

que durante el embarazo existe una regulación mutua entre ambos receptores a Ang II: probablemente el receptor AT_2 , al estar aumentado durante el embarazo, disminuye el efecto contráctil del AT_1 al liberar mediadores endoteliales como el ON, que como se sabe, estimula la liberación de este mediador endotelial en aorta de bovinos y en vasos sanguíneos aislados, así como en microvasos coronarios de perro y arterias coronarias (Wiemer et al., 1993; Saito et al., 1996; Seyedi et al., 1995; Thorup et al., 1998; Thorup et al., 1999).

Por otro lado, y para tratar de explicar el efecto atenuado de la respuesta contráctil durante el embarazo, se determinó la producción del heterodímero AT_1/AT_2 en los dos segmentos de la aorta en ratas no embarazadas y embarazadas (Figs. 47, 48 y 49). Se sabe que existe una interacción entre los receptores AT_1 y AT_2 , de hecho, Munzenmaier y Greene (1996) reportaron que las ratas a las cuales se les administró Ang II junto con PD 123319 en infusión presentaban un incremento en la presión sanguínea mayor que cuando se administraba Ang II solamente, lo que demuestra que la acción del receptor AT_2 causa una inhibición de la respuesta presora mediada por el receptor AT_1 , y que la infusión de losartan (antagonista específico de receptores AT_1) junto con Ang II mostraba una disminución de la respuesta presora mayor que cuando se administraba losartan sólo, implicando un efecto vasodilatador mediado por el receptor AT_2 (Munzenmaier y Greene, 1996). Un estudio realizado por Zwart y col. (1998) en arteria uterina de ratas Sprague-Dawley muestran que la respuesta contráctil a Ang II esta mediada por el receptor AT_1 y que el receptor AT_2 inhibe esta respuesta. Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición mediada por el receptor AT_2 persiste en presencia de un antagonista específico para el mismo (Akashita M y col., 1999; Cox BE y col., 1996) sugiriendo que el receptor AT_2 produce esta inhibición de manera independiente de ligando. En estudios previos se ha demostrado que el receptor AT_1 puede formar heterodímeros con otros receptores, como el receptor a bradicinina B_2 (AbdAlla S y col., 2000, 2001) e incluso con el receptor AT_2 en tejido de miometrio de mujeres embarazadas y no embarazadas así como en fibroblastos fetales (AbdAlla S y col., 2001), y se ha demostrado que la heterodimerización de éstos receptores es independiente de

ligando. También se ha demostrado que el antagonismo del receptor AT_1 mediado por el AT_2 está relacionado por la formación del heterodímero entre ambos receptores. Estos descubrimientos son compatibles con el concepto de que el receptor AT_2 estabiliza o induce un cambio conformacional del receptor AT_1 necesario para la activación de la proteína G. Dicho lo anterior se puede sugerir que la respuesta atenuada a la Ang II durante el embarazo pudiera deberse en parte a la formación del heterodímero AT_1/AT_2 durante este estado, y que este fenómeno se encuentra regionalizado, siendo el segmento abdominal de la aorta de rata el que presenta mayor presencia del heterodímero (Figs. 47,48,49).

Para evaluar la participación del ON en la respuesta contráctil a Ang II se utilizó como herramienta el inhibidor L-NAME, con el objeto de bloquear la síntesis de ON y poner de manifiesto de ésta forma, la participación de este mediador. El L-NAME es un inhibidor competitivo no selectivo de la sintasa de óxido nítrico (Olken y col., 1991). El uso de este inhibidor permitió conocer las diferencias entre los dos segmentos de la aorta, y la influencia que el embarazo puede tener sobre la actividad del ON en la respuesta contráctil a Ang II.

De esta forma, la incubación con L-NAME ($1 \times 10^{-4} M$) produjo en el segmento torácico un incremento en la contracción, que resultó estadísticamente significativo en los anillos de aorta de ratas no embarazadas. Se sabe que frente a un estímulo contráctil, como respuesta moduladora, el vaso compensa con la producción de sustancias vasorelajantes, en particular ON. Lo anterior sugiere que este último participa modulando la respuesta contráctil a Ang II en el segmento torácico de la aorta de ratas no embarazadas, pero parece no tener un papel muy importante en el segmento abdominal de estos animales ni en el mismo segmento de animales embarazados, ya que nuestros resultados muestran que la respuesta contráctil a Ang II no se ve modificada en presencia de L-NAME en este segmento (Figs. 20, 21 y tabla 2).

Con el objeto de observar si la SONE se modifica durante el embarazo se midió la expresión proteica de la misma en ambos segmentos de la aorta de ratas no embarazadas y embarazadas, obteniendo que la expresión proteica de la SONE

no se modifica en el segmento torácico por acción del embarazo, pero aumenta durante el mismo en el segmento abdominal (Figs. 26, 27 y 28). Estos resultados parecen no concordar con la respuesta contráctil, dado que esta última sugiere que en el segmento torácico existe una mayor participación del ON cuando no hay embarazo, mientras que en el segmento abdominal existe una sobreexpresión de esta enzima durante el embarazo y en la respuesta contráctil a Ang II en los anillos incubados con L-NAME no se observan cambios significativos. Cabe recordar, sin embargo, que la expresión proteica de la SONE no significa necesariamente un incremento en la producción de ON, ya que la actividad enzimática puede ser independiente de la expresión proteica de la enzima (St-Louis J y col., 2001; Díaz-Cazorla M y col., 1999; Alexander BT y col., 1999). Los resultados anteriores confirman que el efecto del embarazo no es homogéneo a lo largo de la aorta, y al parecer el ON no es responsable de modular la respuesta a vasoconstrictores en la aorta abdominal de la rata virgen o embarazada.

Lo anterior nos lleva a pensar que durante el embarazo podría participar otro mediador relajante que no es el ON, surgiendo la posibilidad de que la prostaciclina (PGI_2), la principal PG producida por el endotelio y el principal producto del ácido araquidónico con actividad relajante, tuviera un papel. El rol que juegan las prostaglandinas en el embarazo ha sido estudiado de manera extensa en humanos y animales (Meese y col., 1979; Barrow y col., 1983). Se ha descrito, por ejemplo, que un aumento en la producción de prostaglandinas con acción vasodilatadora ejerce una atenuación de la respuesta a estímulos vasoconstrictores durante este estado fisiológico (Gant y col., 1987). Sin embargo, algunos estudios como el realizado por Bobadilla en su trabajo de tesis doctoral (Tesis 1998), muestran que al contrario de lo esperado durante el embarazo en el segmento abdominal, parece participar una PG vasocontráctil, pues al inhibir con indometacina la respuesta contráctil a metoxamina disminuye de manera significativa; este fenómeno se repite al utilizar 5-Hidroxitriptamina como agente contráctil (Bobadilla y col. 2004).

Con el fin de determinar si mediante la estimulación con Ang II se presenta el fenómeno anterior de una prostaglandina contráctil o si, por el contrario, se induce la liberación de PGI₂ mediante la estimulación de receptores AT₁, se incubaron anillos aórticos en presencia del inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa, indometacina (1X10⁻⁶M), encontrando que ésta produce una disminución del Em_{ax} en los anillos de aorta de ratas embarazadas (Figs. 29, 30 y Tabla 3), en ambos segmentos y una disminución de la afinidad en el segmento abdominal. Estos resultados son congruentes con los de Bobadilla y col. (1998 y 2004), por lo que se deduce que la PGI₂ no parece participar en la modulación de la contracción por Ang II en ninguno de los segmentos de aorta de rata embarazada y no embarazada. Por el contrario, considerando que la indometacina inhibe tanto PG vasodilatadoras como vasoconstrictoras, se pone en evidencia la participación de un prostanóide contráctil, probablemente la PGH₂ o el 20-ácido hidroxieicosatetraenoico (20-HETE) porque los niveles tanto de sintasas de prostaciclina y tromboxano A₂ (TXA₂) se encuentran disminuídas en aorta de ratas embarazadas (Davidge ST y col., 1993). La contribución de una prostaglandina vasocontráctil en la aorta abdominal ha sido establecida previamente en animales no preñados (Lamb VL y col., 1994; Asbun-Bojalil J y col., 2002).

Después de una revisión exhaustiva de la bibliografía, este parece ser el primer reporte de la presencia de la isoforma COX 2 en tejido aórtico. Queda por determinar posteriormente el origen celular de esta isoforma. Nuestros resultados muestran que la expresión proteica de ambas isoenzimas de la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2, se encuentran aumentadas en la aorta abdominal durante el embarazo (Figs. 35, 36, 37, 42, 43 y 44). Un estudio realizado por Young W y col. (2000) demostró que niveles elevados de Ang II incrementaban la expresión génica y proteica de la COX-2 y posiblemente producen un aumento de TXA₂ en células de músculo liso vascular (CMLV), y este fenómeno está mediado por los receptores AT₁ (Hu y col., 2002). Esto explicaría el aumento de ésta isoenzima durante el embarazo, puesto que durante este estado existe un aumento en las concentraciones séricas de Ang II. Por otro lado se sabe que la COX-1 es una

enzima constitutiva en una gran variedad de tejidos, entre ellos el endotelio y es la encargada de la producción basal de PG para el mantenimiento de las funciones biológicas en las que éstas participan. Ambas isoenzimas catalizan los primeros dos pasos de la síntesis de las prostaglandinas que son, la oxidación del ácido araquidónico para producir el hidroxí-endoperóxido PGG_2 y su subsecuente reducción a hidroxíendoperóxido PGH_2 , la cual se transforma, por diversos mecanismos enzimáticos, en prostanoides primarios (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 y TXA_2) (Vane y col., 1998; Baudendistel y col., 1997). La liberación de factores vasoconstrictores endoteliales producidos por la COX se asocian con un incremento en la expresión de COX-1 y COX-2 en la aorta y arteria mesentérica (Matz y col., 2000). Considerando que durante el embarazo existe un aumento en la concentración sérica de Ang II, y que el aumento de éste péptido induce la expresión de la COX-2 mediante el receptor AT_1 , entonces se podría explicar de esta forma, que durante el embarazo exista un aumento de la expresión proteica de la isoenzima COX-1. Sin embargo se debe tener precaución al hacer una correlación directa entre datos funcionales que muestran liberación de productos vasoconstrictores por la COX y la expresión de las 2 isoformas ya que ambas tienen la capacidad de producir factores relajantes y constrictores (Matz y col., 2000).

Los resultados obtenidos y presentados aportan una mayor información acerca de la reactividad vascular durante el embarazo para tratar de comprender los mecanismos fisiológicos probables y las adaptaciones endoteliales a las cuales está sometido el organismo durante este periodo gestacional.

12. CONCLUSIONES

1. Los resultados sugieren que la respuesta atenuada a la Ang II durante el embarazo se puede explicar parcialmente por un aumento en la expresión de los receptores AT_2 y a la heterodimerización de los receptores a Ang II. Este efecto se regionaliza en la aorta durante el embarazo.
2. La respuesta contráctil a Ang II parece no estar modulada por una participación importante del ON a pesar de que la NOSe se encuentre aumentada en el segmento abdominal de la aorta de ratas embarazadas.
3. Debido a la disminución de la respuesta contráctil a Ang II en presencia de indometacina posiblemente esté participando un prostanoide vasoconstrictor.
4. Un incremento en la expresión proteica de ambas isoformas de COX en el segmento abdominal de la aorta, sugiere un incremento en la participación de prostaglandinas en este segmento.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001; 276(43):39721-6.
- AbdAlla S, Lothar H, El-Massier A, Quitterer U. Increased AT₁ receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature Medicine.* 2001; 7(9):1003-9.
- AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT₁-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature.* 2000; 407:94-8.
- Abhold RH, Sullivan MJ, Wright JW, Harding JW. Binding, degradation and pressor activity of angiotensins II and III after aminopeptidase inhibition with amastatin and bestatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Sep;242(3):957-62.
- Akishita M, Ito M, Lehtonen JYA, Daviet L, Dzan VJ, Horiuchi M. Expression of the AT₂ receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth. *J Clin Invest.* 1999; 103:63-71.
- Akishita M, Iwai M, Wu L, Zhang L, Ouchi Y, Dzau VJ, Horiuchi M. Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation.* 2000 Oct 3;102(14):1684-9.
- Alexander B.T., Miller M.T., Kassab S., Novak J., Reckelhoff J.F., Kruckeberg W.C., Granger J.P. (1999). Differential Expression of Renal Nitric Oxide Synthase Isoforms During Pregnancy in rats. *Hypertension.* 33(part II): 435-439.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT₁ receptors. *Am J Hypertens.* 2000 Jan;13(1 Pt 2):315-385. Review
- Anderson GH Jr, Streeten DH, Dalakos TG. Pressor response to 1-sar-8-ala-angiotensin II (saralasin) in hypertensive subjects. *Circ Res.* 1977 Mar;40(3):243-50.
- Asbun-Bojalil J, Castillo EF, Escalante BA, Castillo C. Does segmental difference in alpha 1-adrenoceptor subtype explain contractile difference in rat abdominal and thoracic aortae? *Vascul Pharmacol.* 2002 Mar;38(3):169-75.
- Barrow SE, Heavey DJ, Jacqz E, Blair IA, Dollery CT. Des-amino-D-arginine vasopressin does not increase circulating levels of prostacyclin or thromboxane A₂ during infusion in man. *Thromb Haemost.* 1983 Aug 30;50(2):622. No abstract available.
- Bell C. and Coffey C. (1982). Factors influencing estrogen-induced sensitization to acetylcholine of guinea-pig uterine artery. *J. Reprod. Fertil.* 66:133-137.

Bird IM. Size separation and quantification of mRNA by northern analysis. *Methods Mol Biol.* 1998;105:325-36. Review.

Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR, Himmelsbach RJ, Chucholowski A, Connolly CJ, Neergaard SJ, Van Nieuwenhze MS, Sebastian A, Quin J 3rd, et al. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT₂ subtype. *J Med Chem.* 1991 Nov;34(11):3248-60.

Bobadilla R.A., Castillo H.C., Castillo H.E., Escalante B., Hong E. (1997). Possible Involvement of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Vascular Responses of Abdominal Aorta From Pregnant Rats. *Hypertension* 30: 596-601.

Bobadilla RA, Bracho I, Alvarez VM, Anguiano L, Lopez P. Pregnancy induced changes in Cox-1, Cox-2 and NOSIII vascular and renal expression. *Proc West Pharmacol Soc.* 2004;47:25-7.

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF and Muñoz JM (1940) The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 98:283–298.

Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 1994 Jul;26(7):809-20.

Brown G.P. and Venuto R.C. (1991). Renal blood flow response to angiotensin II infusions in conscious pregnant rabbits. *Am. J. Physiol.* 261 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 30): F51-F59.

Brown G.P., Venuto R.E. (1988). In vitro renal eicosanoid production during pregnancy in rabbits. *Am J Physiol* 254: E687.

Brown GP, Venuto RC. In vitro renal eicosanoid production during pregnancy in rabbits. *Am J Physiol.* 1988 Jun;254(6 Pt 1):E687-93.

Bumpus FM, Schwartz H and Page IH (1957) Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science (Wash DC)* 125:886–887.

Bunning P, Holmquist B, Riordan JF. Substrate specificity and kinetic characteristics of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry.* 1983 Jan 4;22(1):103-10.

Bussolino F., Benedetto C., Massobrio M., Camussi G. (1980). Maternal vascular prostacyclin activity in pre-eclampsia. *Lancet* 2: 702.

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.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest.* 1987 Jan;79(1):1-6. Review.

Chu Z.M. and Beilin L.J. (1993 b). Mechanisms of vasodilatation in pregnancy; studies of the role of prostaglandins and nitric oxide in changes of vascular reactivity in the *in situ* blood perfused mesentery of pregnant rats. Br. J. Pharmacol. 109: 322-329.

Chu Z.M. and Beilin L.J. (1993a). Nitric oxide-mediated changes in vascular reactivity in pregnancy in spontaneously hypertensive rats. Br. J. Pharmacol. 110: 1184-1188.

Chu ZM, Beilin L J . Mechanisms of vasodilatation in pregnancy; studies of the role of prostaglandins and nitric oxide in changes of vascular reactivity in the *in situ* blood perfused mesentery of pregnant rats. Br J Pharmacol. 1993; 109: 322-329.

Clauser E, Gaillard I, Wei L, Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. Am J Hypertens. 1989 May;2(5 Pt 1):403-10. Review.

Cockell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. Hypertension. 1997;30(2):247-51

Conrad K.P. (1984). Renal hemodynamics during pregnancy in chronically catheterized, conscious rats. Kidney Int. 26: 24-29.

Conrad K.P. and Colpoys M.C. (1986). Evidence against the hypothesis that prostaglandins are the vasodepressor agents in pregnancy: serial studies in chronically instrumented, conscious rats. J. Clin Invest. 77: 236-45.

Conrad K.P. and Dunn M.J. (1987). Renal synthesis and urinary excretion of eicosanoids during pregnancy in rats. Am J. Physiol 253: F1197.

Conrad K.P. and Dunn M.J. (1992). Renal prostaglandins and other eicosanoids. In: Handbook of Physiology. Renal Physiology. Bethesda, MD. Am. Soc. Physiol., vol II, sect. 8, chapt. 35: 1707-1757.

Conrad K.P. and Russ R.D. (1992). Augmentation of baroreflex mediated bradycardia in conscious, pregnant rats. Am J. Physiol 262 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 31): R472-R477.

Conrad K.P., Joffe G.M., Kruszyna H., Kruszyn R., Rochelle L.G., Smith R.P., Chavez J.E. and Mosher M.D. (1993). Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. FASEB J. 7: 566-571.

Conrad K.P., Morganelli P.M., Brink-Johnsen T., Colpoys M.C. (1989). The renin-angiotensin system during pregnancy in chronically catheterized, conscious rats. Am J. Obstet Gynecol. 161: 1065-72.

Cox BE, Rosenfeld CR, Kalinyak JE, Magness RR, Shaul PW. Tissue specific expression of vascular smooth muscle angiotensin II receptor subtypes during ovine pregnancy. Am J Physiol. 1996 Jul;271(1 Pt 2):H212-21.

Cox BE, Word RA, Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):49-58.

Cox BE, Word RA, Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jan;81(1):49-58.

D'angelo, G. and Osol G. (1993). Regional variation in resistance diameter responses to alpha-adrenergic stimulation during pregnancy. *Am J. Physiol.* 264: H78-H85.

Dadak C, Kefalides A, Sinzinger H, Weber G. Reduced umbilical artery prostacyclin formation in complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1982 Dec 1;144(7):792-5.

Danser AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart.* 1996 Nov;76(3 Suppl 3):28-32. Review.

Danser AH. Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem.* 1996 Apr 12-26;157(1-2):211-6. Review.

Davidge S.T. and McLaughlin M.K. (1992). Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 1691-1698.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):415-72. Review.

de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension.* 1995 May;25(5):924-7.

de Gasparo M, Whitebread S. Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT1 receptors. *Regul Pept.* 1995 Nov 10;59(3):303-11.

De Swiet M. (1980). The cardiovascular system. In Hytten FE, Chamberlain GVP (eds): *Clinical Physiology in Obstetrics.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp 3.

Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Lamas S. Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999 May;10(5):943-52.

Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Ros J, Jimenez W, Fresno M, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells--transcriptional inhibition by IL-13. *Eur J Biochem.* 1999 Feb;260(1):268-74.

DiBona G.F. (1986). Prostaglandin and nosteroidal anti-inflammatory drugs. Effects on renal hemodynamics. *Am J. Med.* 80, Suppl. 1: 12-21.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond).* 2001 May;100(5):481-92. Review.

Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol.* 1988 Oct;255(4 Pt 2):F563-73. Review.

Dzau VJ, Pratt RE, Paul M, Nakamura N. Molecular studies of human renin synthesis and gene expression. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1988 Nov;2(4):459-62. Review. No abstract available.

Dzau VJ. Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects. *Am J Med.* 1988 Mar 11;84(3A):22-7.

Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation.* 1988 Jun;77(6 Pt 2):14-13. Review.

Dzau VJ. Evolving concepts of the renin-angiotensin system. Focus on renal and vascular mechanisms. *Am J Hypertens.* 1988 Oct;1(4 Pt 2):3345-3375. Review.

Dzau VJ. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. *J Hypertens Suppl.* 1988 Dec;6(3):S7-12. Review.

Dzau VJ. Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension.* 1986 Jul;8(7):553-9. Review.

Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system: physiologic and pharmacologic implications. Introduction. *Circulation.* 1988 Jun;77(6 Pt 2):11-3.

Elliott DF and Peart WS (1956) Amino acid sequence in a hypertensin. *Nature (Lond)* 177:527-528.

Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension.* 1991 Nov;18(5 Suppl):III126-33. Review.

Ferrario CM, Jaiswal N, Yamamoto K, Diz DI, Schiavone MT. Hypertensive mechanisms and converting enzyme inhibitors. *Clin Cardiol.* 1991 Aug;14(8 Suppl 4):IV56-62; discussion IV83-90. Review.

Gant N.F., Whalley P.J., Evererr R.B., Worley R.J., MacDonald P.C. (1987). Control of vascular reactivity in pregnancy. *Am J Kidney Dis.* 9: 303-7.

Gant NF, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1974 Jun;43(6):854.

Gant NF, Chand S, Worley RJ, Whalley PJ, Crosby UD, MacDonald PC. A clinical test useful for predicting the development of acute hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1974 Sep;120(1):1-7.

Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest.* 1973 Nov;52(11):2682-9.

Gill JR. (1980). Bartter' syndrome. *Annu Rev Med* 31: 405.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF and Summerville WW (1934) Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59:347-349.

Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res.* 1992 Dec;71(6):1482-9.

Gregg AR, Thompson LP, Herrig JE, Weiner CP. Regionalization of endothelium-dependent relaxation in the thoracic aorta of pregnant and nonpregnant guinea pigs. *J Vasc Res.* 1995 Mar-Apr;32(2):106-11.

Griendling K.K., Alexander R. W. (1996). Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* 10, 283-292.

Griendling KK, Alexander RW. The angiotensin (AT1) receptor. *Semin Nephrol.* 1993 Nov;13(6):558-66. Review.

Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. The vascular angiotensin (AT1) receptor. *Thromb Haemost.* 1993 Jul 1;70(1):188-92. Review.

Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1993 Jun;87(6):1816-28. Review.

Gross F (1968) The regulation of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system under various conditions. *Acta Endocrinol (Copenh)* (Suppl 124):141.

Halligan A, O'Brien E, O'Malley K, Mee F, Atkins N, Conroy R, Walshe JJ, Darling M. Twenty-four-hour ambulatory blood pressure measurements in a primigravid population. *J Hypertens.* 1993; 11:869-873.

- Hayashi T., Yamada K., Esaki T., Kuzuya M., Satake S., Ishikawa T., Hidaka H., Iguchi A. (1995). Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor mediated system. *Biochem Biophys Res Commun.* 214(3): 847-55.
- Hein L, Dzau VJ, Barsh GS. Linkage mapping of the angiotensin AT2 receptor gene (*Agtr2*) to the mouse X chromosome. *Genomics.* 1995 Nov 20;30(2):369-71.
- Hogarty DC, Speakman EA, Puig V, Phillips MI. The role of angiotensin, AT1 and AT2 receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to central angiotensin. *Brain Res.* 1992 Jul 24;586(2):289-94.
- Horiuchi M, Akishita M., Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999;33:613-21.
- Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Nov;303(2):563-73.
- Ichiki T, Inagami T. Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Circ Res.* 1995 May;76(5):693-700.
- Ichiki T, Inagami T. Transcriptional regulation of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Hypertension.* 1995 Apr;25(4 Pt 2):720-5.
- Ichiki T, Kambayashi Y, Inagami T. Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res.* 1995 Dec;77(6):1070-6.
- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995 Oct 26;377(6551):748-50.
- Johns DW, Peach MJ, Gomez RA, Inagami T, Carey RM. Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am J Physiol.* 1990 Dec;259(6 Pt 2):F882-7.
- Kawano M, Mori N. Prostacyclin producing activity of human umbilical, placental and uterine vessels. *Prostaglandins.* 1983 Oct;26(4):645-62.
- Kawano M., Mori N. (1983). Prostacyclin producing activity of human umbilical, placental and uterine vessels. *Prostaglandins* 26: 645.
- Koullapis E.N., Nicolaides K.H., Collins W.P. Rodeck C.H., Campbell S. (1982). Plasma prostanoids in pregnancy-induced hypertension. *Br J. Obstet Gynecol* 89: 617-21.
- Lamb VL, Schwartz AJ, Rohn WR, Kaiser L. Cyclooxygenase inhibitors depress norepinephrine constriction of rat abdominal, but not thoracic, aorta. *Eur J Pharmacol.* 1994 Apr 21;256(2):221-6.

Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997 Jul;30(1):75-83.

Lyll F, Dornan ES, McQueen J, Boswell F, Kelly M. Angiotensin II increases protooncogene expression and phosphoinositide turnover in vascular smooth muscle cells via the angiotensin II AT1 receptor. *J Hypertens.* 1992 Dec;10(12):1463-9.

Mackanjee HR, Shaul PW, Magness RR, Rosenfeld CR. Angiotensin II vascular smooth-muscle receptors are not down-regulated in near-term pregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Dec;165(6 Pt 1):1641-8.

Magness R.R., Rosenfeld C.R., Hassan A. and Shaul P.W. (1996). Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. I effects of ANG II on PGI₂ and NO in pregnancy. *Am J Physiol* 270 (Heart Circ Physiol 39): H1914-23.

Matsuura S, Naden RP, Gant NF Jr, Parker CR Jr, Rosenfeld CR. Effect of volume expansion on pressor response to angiotensin II in pregnant ewes. *Am J Physiol.* 1981 Jun;240(6):H908-13.

Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol.* 2000 Sep;131(2):303-11.

Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res.* 2000;49(1):11-8. Review.

McMullen JR, Gibson KJ, Lumbers ER, Burrell JH. Selective down-regulation of AT2 receptors in uterine arteries from pregnant ewes given 24-h intravenous infusions of angiotensin II. *Regul Pept.* 2001 Jun 15;99(2-3):119-29.

Meese, C. O. Fischer, C., Hoffman, L. H. and Frolich, J. C. (1979) Assessment of uterine and renal prostaglandin synthesis in pregnancy by gas chromatography-mass spectrometry. *INSERM* 91: 167-171

Menard J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J Hypertens Suppl.* 1993 Apr;11(3):S3-11. Review.

Mené P. and Dunn J. (1992). Vascular, glomerular, and tubular effects of angiotensin II kinins and prostaglandins. In: *The kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by D.W. Seldin and G. Giebisch. New York: Raven. 1992, 1205-1248.

Mené P. and Dunn J. Vascular, glomerular and tubular effects of angiotensin II kinins and prostaglandins. In *The Kidney Physiology and Pathophysiology*, edited by D. W. Seldin and G. Giebisch. New York: Raven. 1992, 1205-1248.

Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G, Catt KJ. Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15;88(24):11440-4.

Millan MA, Kiss A, Aguilera G. Developmental changes in brain angiotensin II receptors in the rat. *Peptides*. 1991 Jul-Aug;12(4):723-37.

Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*. 1996 Mar;27(3 Pt 2):760-5.

Olken NM, Rusche KM, Richards MK, Marletta MA. Inactivation of macrophage nitric oxide synthase activity by NG-methyl-L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Jun 14;177(2):828-33.

Paller MS. Potassium depletion and regulation of angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. *J Recept Res*. 1989;9(1):95-106.

Pan ZR, Lindheimer M, Bailin J, Barron WM. Regulation of blood pressure in pregnancy: pressor system blockade and stimulation. *Am J Physiol*. 1990; 258(27):H1559-H1572.

Parent A., Schiffrin E.L. and St-Louis. (1991). Receptors for arg⁸-vasopressin, angiotensin II, and atrial natriuretic peptide in the mesenteric vasculature of pregnant rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 69:137-144.

Perez-Alvarez V, Bobadilla RA, Hong E. Direct effects of new indorenate analogs on blood pressure of pithed rats. *Proc West Pharmacol Soc*. 1998;41:95-7

Pitt B, Konstam MA. Overview of angiotensin II-receptor antagonists. *Am J Cardiol*. 1998 Nov 19;82(10A):475-495. Review.

Poston L., McCarthy A.L. and Ritter J.M. (1995). Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol. Ther*. 65: 215-239.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990 Nov;101(3):746-52.

Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol*. 1989; 256:265

- Rosenfeld CR, Cox BE, Magness RR, Shaul PW. Ontogeny of angiotensin II vascular smooth muscle receptors in ovine fetal aorta and placental and uterine arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 May;168(5):1562-9.
- Rosenfeld CR, Gant NF Jr. The chronically instrumental ewe: a model for studying vascular reactivity to angiotensin II in pregnancy.
- Rosolowsky M, Falck JR, Willerson JT, Campbell WB. Synthesis of lipoxygenase and epoxygenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res.* 1990 Mar;66(3):608-21.
- Roulston CL, Lawrence AJ, Jarrott B, Widdop RE. Localization of AT₂ receptors in the nucleus of the solitary tract of spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats using [125I] CGP42112: upregulation of a non-angiotensin II binding site following unilateral nodose ganglionectomy. *Brain Res.* 2003 Apr 4;968(1):139-55.
- Sandberg K, Ji H, Catt KJ. Regulation of angiotensin II receptors in rat brain during dietary sodium changes. *Hypertension.* 1994 Jan;23(1 Suppl):1137-41.
- Sasaki k, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murria JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-I receptor. *Nature.* 1991;351:230-3.
- Sealy WC, Panijayanond P, Alexander J, Seaber AV. Activity of plasma angiotensin II in experimental coarctation of the aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1973 Feb;65(2):283-91
- Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am J Physiol.* 1992 Feb;262(2 Pt 2):F236-40.
- Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension.* 1995 Jul;26(1):164-70.
- Siragy HM and Carey RM (1999) Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33:1237–1242.
- Siragy HM, Bedigian M. Mechanism of action of angiotensin-receptor blocking agents. *Curr Hypertens Rep.* 1999 Aug;1(4):289-95. Review.
- Siragy HM, Corey RM. Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension.* 1999;33:1237-42.
- Siragy HM, Corey RM. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997;15(100):264-9.

Siragy HM, de Gasparo M, Carey RM. Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *Hypertension*. 2000 May;35(5):1074-7.

Siragy HM, de Gasparo M, Carey RM. Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *Hypertension*. 2000 May;35(5):1074-7.

Siragy HM, de Gasparo M, El-Kersh M, Carey RM. Angiotensin-converting enzyme inhibition potentiates angiotensin II type 1 receptor effects on renal bradykinin and cGMP. *Hypertension*. 2001 Aug;38(2):183-6.

Siragy HM. Angiotensin II subtype-2 receptor influences kininogenase activity *Am J Kidney Dis*. 2000 Nov;36(5):1071-4. No abstract available.

Siragy HM. AT(1) and AT(2) receptors in the kidney: role in disease and treatment. *Am J Kidney Dis*. 2000 Sep;36(3 Suppl 1):S4-9.

Siragy HM. The role of the AT2 receptor in hypertension. *Am J Hypertens*. 2000 May;13(5 Pt 2):625-675. Review.

Skeggs LT, Lentz KE, Kahn Jr, Shumway NP and Woods KR (1956) The amino acid sequence of hypertensin II. *J Exp Med* 104:193-197.

Tanabe A, Naruse M, Arai K, Naruse K, Yoshimoto T, Seki T, Imaki T, Kobayashi M, Miyazaki H, Demura H. Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol Invest*. 1998 Nov;21(10):668-72.

Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS, Moore LC. AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jan;10 Suppl 11:S220-4.

Thorup C, Kornfeld M, Winaver JM, Goligorsky MS, Moore LC. Angiotensin-II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries. *Pflugers Arch*. 1998 Feb;435(3):432-4.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993 Jun;45(2):205-51. Review. No abstract available.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):639-72. Review.

Tsutsumi K, Saavedra JM. Angiotensin-II receptor subtypes in median eminence and basal forebrain areas involved in regulation of pituitary function. *Endocrinology*. 1991 Dec;129(6):3001-8.

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl*. 1996 Dec;14(5):S95-103. Review.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:97-120. Review.

Weiner C.P., Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994a). Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, (in press).

Weiner C.P., Liu K.Z., Thompson L., Herring J., Chestnut D. (1991). Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: their role in reduced adrenergic sensitivity. *Am J. Physiol*. 261: H1275-83.

Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S. (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 91: 5212-5216.

Weiner CP, Thompson LP, Liu KZ, Herrig JE. Pregnancy reduces serotonin induced contraction of guinea pig uterine and carotid arteries. *Am J Physiol*. 1992 Dec;263(6 Pt 2):H1764-9.

Weiner CP, Thompson LP, Liu KZ, Herrig JE. Pregnancy reduces serotonin induced contraction of guinea pig uterine and carotid arteries. *Am J Physiol*. 1992 Dec;263(6 Pt 2):H1764-9.

Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor-alpha- and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000 Apr 28;86(8):906-14.

Zhuo J, Alcorn D, McCausland J, Mendelsohn FA. Localization and regulation of angiotensin II receptors in renomedullary interstitial cells. *Kidney Int*. 1994 Dec;46(6):1483-5. Review. No abstract available.

Zhuo J, Song K, Abdelrahman A, Mendelsohn FA. Blockade by intravenous losartan of AT1 angiotensin II receptors in rat brain, kidney and adrenals demonstrated by in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994 Jul;21(7):557-67.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific

aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11968-73.

Zwart AS, Davis EA, Widdop RE. Modulation of AT1 receptor-mediated contraction of rat uterine artery by AT2 receptors. *Br J Pharmacol.* 1998 Dec;125(7):1429-36.