



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

**Facultad de Química**

**PAPEL DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO  
ENDOTELIAL Y SU ACOUPLE EN EL DAÑO RENAL  
AGUDO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JUÁREZ CORREA MAYRA SARAHI**



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ  
**VOCAL:** EUCLIDES AVILA CHÁVEZ  
**SECRETARIO:** LUZ GRACIELA CERVANTES PÉREZ  
**1er. SUPLENTE:** GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA  
**2° SUPLENTE:** PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE REACTIVIDAD VASCULAR  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA  
“IGNACIO CHÁVEZ”

**ASESOR DEL TEMA:** DRA. LUZ GRACIELA CERVANTES PÉREZ

---

(Nombre y firma)

**SUSTENTANTE :** JUÁREZ CORREA MAYRA SARAHI

---

(Nombre y firma)

## ABREVIATURAS

ADMA	Dimetil-arginina asimétrica
Agt	Angiotensinógeno
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang-(1-9)	Angiotensina 1-9
AT <sub>1</sub>	Receptor a angiotensina II tipo 1
AT <sub>2</sub>	Receptor a angiotensina II tipo 2
BH <sub>2</sub>	Dihidrobiopterina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPR	Dihidropteridina
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECA-2	Enzima convertidora de angiotensina-2
EGTA	Ácido etilenglicol tetra acético
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FG	Filtrado glomerular
FMN	Flavina mononucleótido
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPCH-I	GTP ciclohidrolasa I
IARF	Isquemia del fallo renal agudo
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
IRA	Insuficiencia renal aguda
IRC	Insuficiencia renal crónica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido
NFx 5/6	Nefrectomía 5/6
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal
NOS	Sintasa del óxido nítrico
NTA	Necrosis tubular aguda
NO	Óxido nítrico

PTPS	6-piruvoil-tetrahidrobiopterina sintasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SR	Sepiapterina reductasa
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldoterona

# ÍNDICE

	Página
<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1.-SISTEMA RENAL Y URINARIO</b> .....	2
1.1.1.- Anatomía del riñón humano .....	2
1.1.2.-Filtración glomerular .....	5
1.1.3.-Ultrafiltrado glomerular .....	7
1.1.4.-Regulación renal ácido- base renal.....	11
1.1.5.-Secreción de hormonas .....	12
<b>1.2.-FUNCIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL</b> .....	12
<b>1.3.-REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL</b> .....	13
1.3.1.-Sistema Renina Angiotensina Aldosterona .....	14
1.3.2.-Angiotensina II .....	16
1.3.3.- Angiotensina- (1-7).....	17
1.3.4.-Receptor MAS.....	19
<b>1.4.-ÓXIDO NÍTRICO</b> .....	20
1.4.1.-Sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS).....	21
1.4.2.-Biosíntesis y metabolismo de la tetrahydrobiopterina (BH <sub>4</sub> ).....	22
1.4.3.-Papel protector del óxido nítrico derivado de eNOS.....	24
<b>1.5.-INSUFICIENCIA RENAL</b> .....	24
1.5.1.-Insuficiencia renal aguda.....	24
1.5.1.1.-Clasificación etiológica.....	24
1.5.2.-Criterios de clasificación que describen la gravedad de la lesión renal aguda.....	26
<b>1.6.-HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y LA RELACION CON LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA</b> .....	28
<b>2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	29
<b>3.-HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4.-OBJETIVOS</b>	
4.1.-Objetivo generales.....	30
4.2.-Objetivos particulares.....	30
<b>5.-DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	31
<b>6.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	32
6.1.- Registro de la presión arterial intracarotídea .....	32
6.2.-Nefrectomía 5/6.....	33
6.3.-Homogenización de muestras para western blot.....	34
6.4.-Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	34
6.5.-Evaluación de la expresión proteica.....	35
6.6.-Determinación de Ang II, Ang-(1-7), BH <sub>2</sub> , BH <sub>4</sub> por electroforesis capilar.....	36
6.7.-Actividad de la sintasa del óxido nítrico.....	36
6.8.-Análisis de resultados.....	38
<b>7.-RESULTADOS</b> .....	39
<b>8-DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>9.-CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>10.- REFERENCIAS</b> .....	61

## RESUMEN

La lesión renal aguda es un problema clínico cada vez más frecuente en los pacientes con hipertensión arterial debido a la disminución de las nefronas funcionales que conlleva a daño glomerular asociado con hipertensión. Otros factores que favorecen la hipertensión arterial en presencia de la insuficiencia renal son: el déficit del óxido nítrico y la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona contribuyendo a la patogénesis de la hipertensión arterial en el daño renal.

Debido a ello evaluamos la expresión y funcionalidad de la sintasa del óxido nítrico endotelial, la producción de angiotensina II y angiotensina-(1-7) en el modelo de rata con nefrectomía 5/6. Se usaron ratas Wistar macho de 300 g las cuales se dividieron en 5 grupos experimentales con diferentes tiempos de isquemia: 0 min (sham), 30, 60 y 90 minutos. Se midió la presión arterial en las ratas Sham y nefrectomizadas 5/6 a los distintos tiempos de isquemia, donde se observó un aumento de la presión arterial sistólica a partir de los 30 minutos. Con el daño renal se observó una disminución de la concentración de tetrahidrobiopterina y el incremento en la concentración de dihidrobiopterina en el riñón. La actividad y la expresión de la sintasa del óxido nítrico dependiente de calcio mostraron tendencias a disminuir en función del tiempo, mientras que la sintasa del óxido nítrico independiente de calcio no presentó diferencia entre grupos en su actividad pero se observó un incremento significativo en su expresión a los 30 y 60 minutos posterior a la isquemia.

La concentración de angiotensina-(1-7) en tejido se encontró disminuida a los 30 y 60 minutos, la angiotensina-(1-7) tiene un efecto vasodilatador que al interactuar con el receptor MAS, también puede hacerlo recíprocamente con el receptor AT<sub>2</sub>.

# **1.- INTRODUCCIÓN**

## **1.1.- SISTEMA RENAL Y URINARIO**

El riñón es un órgano con varias funciones de vital importancia:

- 1) filtrar los productos residuales de la sangre y producir orina.
- 2) reabsorción.
- 3) el mantenimiento de la homeostasis.
- 4) la regulación de la presión arterial.
- 5) secreción de hormonas.

### **1.1.1.- Anatomía del riñón humano**

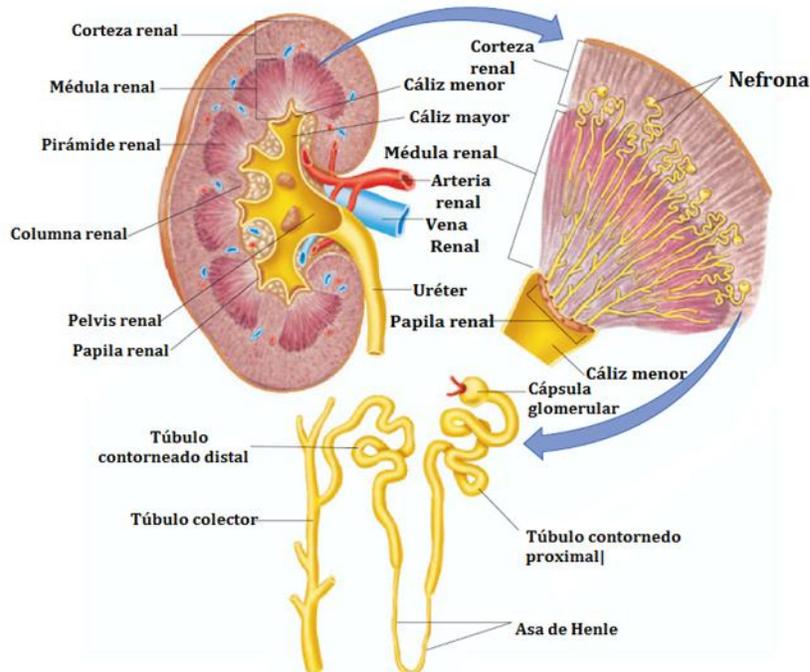
En los humanos los riñones se presentan como un par de órganos que pesan 160 g aproximadamente; miden 11 cm de longitud y de 5 a 7 cm de ancho. Se encuentran situados en la parte posterior de la cavidad abdominal, a cada lado de las últimas vértebras torácicas, a unos centímetros a la derecha y a la izquierda de la columna vertebral.

En condiciones anatómicas normales cada riñón es exactamente igual al otro, sin embargo, el riñón derecho está situado un poco más abajo que el riñón izquierdo, esto se debe a que el hígado ocupa un espacio considerable en el lado derecho de la cavidad abdominal por encima del riñón.

La orina producida en los riñones se vacía en una cavidad que se conoce como pelvis renal y después se canaliza desde cada riñón a través de conductos largos conocidos como uréteres hacia la vejiga urinaria.

En el riñón se puede identificar la corteza (capa exterior) que es de color marrón rojizo y de aspecto granular por sus numerosos capilares; la médula de color más claro y debido a la presencia de túbulos microscópicos y vasos sanguíneos presenta una apariencia lisa; y la papila donde se ubican las pirámides renales que se proyectan a una pequeña depresión que se denomina cáliz menor. Varios cálices menores se unen para formar un cáliz mayor. Los cálices mayores se

reúnen para formar la pelvis renal que es la encargada de recoger la orina de los cálices y la transporta a los uréteres y a la vejiga urinaria (Figura 1).



**Figura 1.- Estructura del riñón.** Esquema representativo de la vista macroscópica y microscópica del riñón. La imagen muestra el corte sagital de un riñón en el que se indican las estructuras que lo componen y su ubicación. También se esquematiza la distribución de las nefronas y las partes que la componen (1).

La sangre fluye a la corteza y la médula a través de la arteria renal, que se ramifica en arterias cada vez más pequeñas. Cada una de las arterias termina en una unidad de filtración sanguínea denominada nefrona.

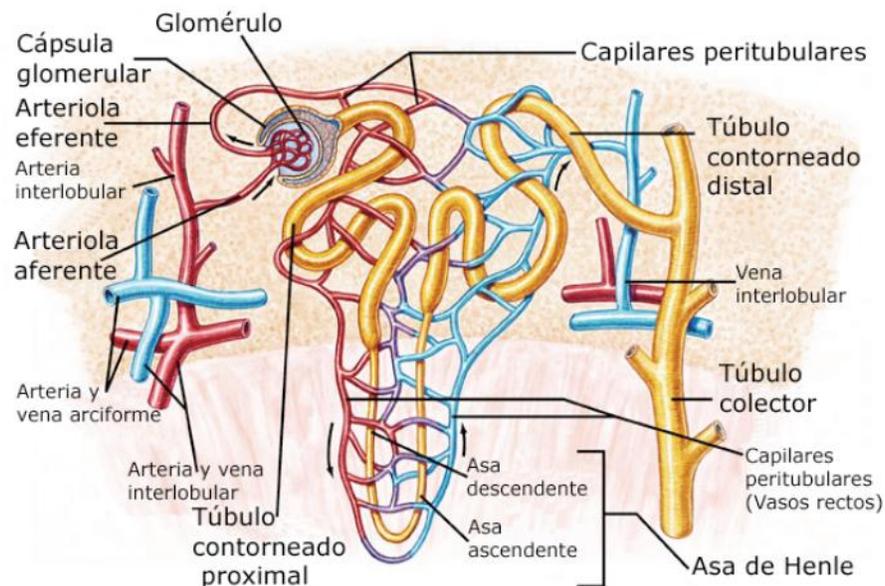
La nefrona es la unidad funcional de los riñones, hay aproximadamente 1 millón de nefronas por riñón, cada nefrona consta de pequeños túbulos y pequeños vasos sanguíneos asociados a ellos.

La porción tubular de una nefrona consta de una cápsula glomerular llamada cápsula de Bowman que rodea al glomérulo. La cápsula de Bowman contiene una

capa visceral interna de epitelio que envuelve a los capilares glomerulares y una capa parietal externa.

El filtrado que penetra en la cápsula glomerular pasa a la luz del túbulo contorneado proximal. La pared del túbulo contorneado proximal consta de una única capa de células epiteliales cúbicas que contienen millones de microvellosidades; estas aumentan la superficie de reabsorción. En el proceso de la reabsorción, la sal, el agua y otras moléculas se transportan desde la luz, a través de las células tubulares, a los capilares peritubulares de alrededor.

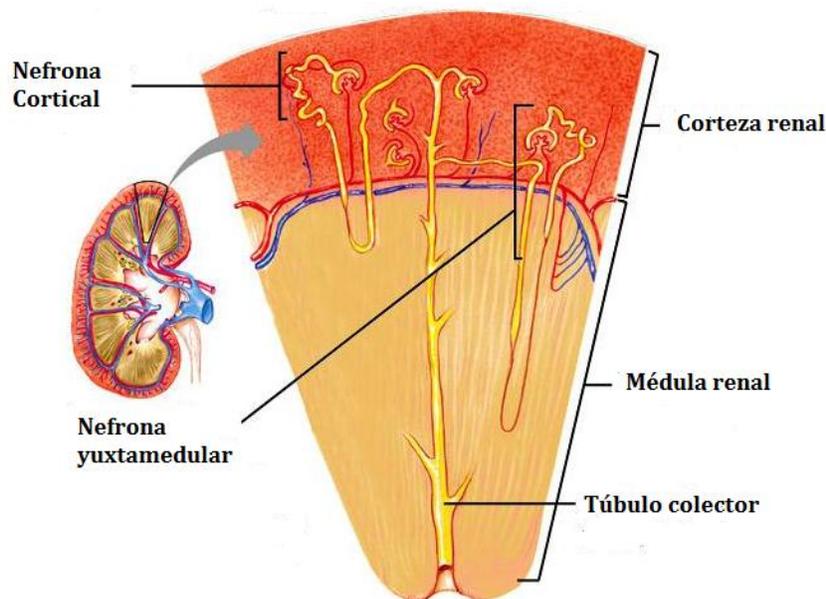
El glomérulo, la cápsula glomerular y el túbulo contorneado están localizados en la corteza renal. El líquido pasa del túbulo contorneado proximal al asa de Henle. Este líquido es transportado a la médula por la rama descendente del asa y regresa a la corteza por la rama ascendente del asa de Henle. De nuevo en la corteza, el túbulo se vuelve a retorcer y se denomina túbulo contorneado distal. El túbulo contorneado distal es más corto que el túbulo proximal y tiene una cantidad relativamente escasa de microvillosidades. El túbulo contorneado distal termina donde comienza el túbulo colector (Figura 2).



**Figura 2.- Esquema mostrando la nefrona y sus componentes.** La imagen muestra en amarillo la estructura de una nefrona y se indican las partes que la conforman. También se representan las arterias (rojo) y venas (azul) que irrigan a las nefronas. Se indica con

flechas el flujo sanguíneo desde un glomérulo a una arteriola eferente, a los capilares peritubulares y al drenaje venoso de los riñones (1).

Los dos tipos principales de nefronas se clasifican según su posición en el riñón y las longitudes de sus asas de Henle. Las nefronas que se originan en el tercio interno de la corteza se denominan *nefronas yuxtamedulares* por lo que son contiguas a la médula y poseen asas de Henle más largas que las denominadas *nefronas corticales*, las cuales son más numerosas y se originan en los dos tercios externos de la corteza (Figura 3). Las nefronas yuxtamedulares desempeñan un papel importante en la capacidad del riñón para producir orina concentrada (1).



**Figura 3.- Localización renal de las nefronas corticales y yuxtamedulares.** En el esquema se presenta a una pirámide renal en la que se identifica la zona correspondiente a la corteza y médula renal así como la ubicación de los dos tipos de nefronas (corticales y yuxtamedulares) (1).

### **1.1.2.- Filtración Glomerular**

Los capilares glomerulares poseen grandes poros en sus paredes, y la capa de la cápsula de Bowman situada en contacto con el glomérulo tienen rendijas de filtración. El agua junto con los solutos disueltos en ella (pero no las proteínas), puede pasar de este modo desde el plasma sanguíneo al interior de la cápsula y

los túbulos de la nefrona. El volumen de filtrado producido por ambos riñones recibe el nombre de filtración glomerular.

Las células endoteliales de los capilares glomerulares poseen grandes poros (200-500 Å de diámetro), denominados fenestraciones. Como resultado de estos grandes poros, los capilares glomerulares son entre 100 y 400 veces más permeables al agua del plasma y a los solutos disueltos que los capilares de los músculos esqueléticos. Aunque los poros de los capilares glomerulares son más grandes, todavía son lo suficientemente pequeños como para impedir el paso al filtrado de glóbulos rojos, leucocitos y de plaquetas.

Antes de que el líquido del plasma sanguíneo pueda penetrar en el interior de la cápsula glomerular, debe filtrarse a través de 3 capas que actúan como filtros selectivos. De esta forma, se denomina filtrado al líquido que entra en la cápsula de Bowman.

La primera barrera de filtración son los capilares fenestrados pero estos poros son demasiado grandes para excluir a cualquier molécula plasmática del filtrado. La segunda barrera es la membrana basal glomerular constituida por una capa de glucoproteínas. El filtrado debe pasar luego a través de la capa interna de la cápsula glomerular, donde se encuentra la tercera barrera de filtración que se denomina diafragma de rendija. Esta capa está formada por células denominadas podocitos, con una forma parecida a la de un pulpo con un cuerpo celular bulboso y varios brazos gruesos. Cada brazo posee miles de extensiones citoplasmáticas conocidas como pedicelos. Estos pedicelos se entrecruzan, como los dedos de las manos cruzadas, envolviéndose alrededor de los capilares glomerulares. Las finas rendijas entre los pedicelos proporcionan las vías de paso a través de las cuales han de pasar las moléculas filtradas para penetrar en el interior de la cápsula de Bowman. Los podocitos recubren el otro lado de la membrana basal y forman parte del recubrimiento del espacio de Bowman. Los podocitos forman una red apretada de procesos interdigitales (pedicelos) que controlan la filtración de proteínas del lumen capilar en el espacio de Bowman. El espacio entre los procesos de los podocitos adyacentes es cerrado por un estrecho diafragma formado por varias

proteínas incluyendo podocina y nefrina. Adicionalmente, los procesos basales tienen una capa cargada negativamente, el glicocálix, que limita la filtración de moléculas cargadas negativamente, esto presenta la tercera barrera de filtración.

Todos los solutos plasmáticos disueltos pasan fácilmente a través de las tres barreras de filtración para penetrar al interior de la cápsula glomerular, la mayoría de las proteínas plasmáticas son excluidas del filtrado debido a sus grandes tamaños y sus cargas netas negativas. Los defectos genéticos de las proteínas que forman el diafragma de rendija dan lugar a una pérdida masiva de proteínas al filtrado y de esta forma se produce proteinuria (proteínas en la orina).

### ***1.1.3.- Ultrafiltrado glomerular***

El líquido que penetra en la cápsula glomerular se denomina filtrado o ultrafiltrado debido a que se forma a presión (presión hidrostática de la sangre).

La tasa de filtración glomerular (FG) es el volumen de filtrado que producen ambos riñones por minuto. La FG promedio es 180 L por día, como el volumen sanguíneo total promedio es de 5.5 L, esto significa que la totalidad del volumen sanguíneo se filtra a los túbulos renales cada cuarenta minutos.

- ***Regulación de la filtración glomerular***

La vasoconstricción o vasodilatación de las arteriolas aferentes afecta a la velocidad del flujo sanguíneo al glomérulo, y de este modo a la filtración glomerular. Las variaciones del diámetro de las arteriolas aferentes son consecuencia de mecanismos reguladores extrínsecos (producidos por inervación simpática) e intrínsecos (los de dentro de los riñones, también denominado autorregulación renal). Estos mecanismos son necesarios para asegurar que la FG será lo suficientemente elevada para permitir a los riñones que eliminen los productos de desecho y regulen la presión arterial, pero no tanto como para provocar una pérdida excesiva de agua.

- ***Regulación extrínseca. Efecto del sistema nervioso simpático.***

La inervación simpática de los riñones está compuesta por una red densa de neuronas post-ganglionares, que van desde el hipotálamo a los riñones a través de los ganglios simpáticos pre y paravertebrales (T10-L2). Los axones de las neuronas preganglionares salen del tronco toraco-lumbar y transitan hasta llegar a los ganglios simpáticos pre y paravertebrales. Las fibras posganglionares que llegan al riñón van a través de las distintas capas de las arterias renales y avanzan hasta el hilio renal. En este punto se dividen en pequeños conjuntos de nervios que siguen la distribución de los vasos sanguíneos hasta el área cortical y yuxtamedular. La activación del nervio simpático renal eleva la producción y liberación de noradrenalina en las terminaciones nerviosas, lo cual genera una vasoconstricción renal, favoreciendo la secreción de renina, la reabsorción de sodio y líquidos. De igual forma, es responsable de la vasoconstricción renal, la disminución del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular. La estimulación del sistema simpático participa en la vasoconstricción a través de dos mecanismos: estimulación de los receptores beta-adrenérgicos del aparato yuxtaglomerular que conduce a estimulación del sistema renina-angiotensina, aumento de la volemia, y estimulación de receptores alfa-adrenérgicos vasculares que producen vasoconstricción directa. Por otra parte, la liberación de renina potencia la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona; este sistema neurohumoral conduce a una mayor expansión de volumen mediada por la aldosterona y a aumento de la activación simpática, vasoconstricción y absorción de agua (a través de la hormona antidiurética secretada por la hipófisis) estimulados por la angiotensina II (2).

- ***Regulación intrínseca. Participación renal.***

Cuando el efecto directo de la estimulación simpática se elimina de forma experimental, se pueden observar los efectos generales de la presión arterial sobre la FG. En estas condiciones la FG permanece relativamente constante a pesar de las variaciones de la presión arterial media dentro de unos límites

situados entre 70 y 180 mmHg. La capacidad de los riñones de mantener la FG relativamente constante cuando la presión arterial fluctúa se denomina autorregulación renal.

Cuando la presión arterial sistémica cae hacia una media de 70 mmHg, las arteriolas aferentes se dilatan, y cuando la presión se eleva, las arteriolas aferentes se contraen.

La retroalimentación tubuloglomerular es un proceso esencial en la autorregulación de la FG. El sensor de la retroalimentación tubuloglomerular está constituido por un grupo de células especializadas denominadas mácula densa, situado en la porción gruesa de la rama ascendente donde forma un bucle hacia atrás y se pone en contacto con las arteriolas aferentes y eferentes de la corteza renal. La mácula densa aquí es parte de una unidad funcional mayor conocida como aparato yuxtaglomerular.

Cuando se aumenta el aporte de NaCl y de H<sub>2</sub>O a los túbulos distales (quizás debido al aumento de la presión sanguínea en el glomérulo, que produce un aumento de la filtración), la mácula densa envía una señal que produce la constricción de la arteriola aferente. Esto hace descender la FG, de forma que entra menos líquido en el túbulo de la nefrona. La homeostasis de la FG y por lo tanto del paso de NaCl y H<sub>2</sub>O a lo largo de túbulo de la nefrona se mantiene de esta manera por el sistema de retroalimentación.

La mayor parte del agua filtrada debe regresar al sistema vascular para mantener el volumen y la presión sanguínea. El regreso de las moléculas filtradas desde los túbulos a la sangre se denomina reabsorción.

- ***Reabsorción en el túbulo proximal***

Aproximadamente el 65 % de la sal y el agua del ultrafiltrado glomerular original se reabsorbe a través del túbulo proximal y regresa al sistema vascular. El volumen del líquido tubular que queda se reduce, pero este líquido sigue siendo isosmótico

con la sangre debido a que el agua y la sal se eliminan en cantidades proporcionales (1).

- ***Transporte activo y pasivo***

La concentración de  $\text{Na}^+$  en el ultrafiltrado glomerular y en el líquido que penetra en el túbulo proximal, es igual a la del plasma, el citoplasma de las células epiteliales del túbulo tiene una concentración de  $\text{Na}^+$  mucho más baja. Esta concentración más baja de  $\text{Na}^+$  se debe a la baja permeabilidad de la membrana celular al  $\text{Na}^+$  y al transporte activo de  $\text{Na}^+$  hacia el exterior de la células por las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Como resultado de la acción de estas bombas de transporte activo, se crea un gradiente de concentración que favorece la difusión de  $\text{Na}^+$  desde el líquido tubular, a través de las membranas celulares apicales y al interior de las células epiteliales del túbulo proximal. Entonces el  $\text{Na}^+$  es expulsado hacia el líquido tisular por las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

El transporte de  $\text{Na}^+$  desde el líquido tubular al líquido intersticial que rodea al túbulo proximal crea una diferencia de potencial a través de la pared del túbulo, siendo la luz el polo negativo. Este gradiente eléctrico favorece el transporte activo del  $\text{Cl}^-$  hacia la concentración más elevada de  $\text{Na}^+$  del líquido intersticial. En consecuencia, los iones cloruro, siguen pasivamente a los iones de sodio desde el filtrado hacia el líquido intersticial. Como resultado de la acumulación de  $\text{NaCl}$ , la osmolaridad y la presión osmótica del líquido intersticial situado entre las membranas laterales de las células epiteliales contiguas, donde la estrechez de los espacios permite que el  $\text{NaCl}$  acumulado alcance una concentración mayor.

Así se crea un gradiente osmótico entre el líquido tubular y el líquido intersticial que rodea al túbulo proximal. La sal y el agua que se reabsorbieron del líquido tubular se pueden mover entonces pasivamente a los capilares peritubulares de alrededor, y de este modo regresan a la sangre (3).

#### **1.1.4.- Regulación renal ácido-base renal**

Los riñones contribuyen a regular el pH sanguíneo eliminando  $H^+$  por la orina y reabsorbiendo bicarbonato. El  $H^+$  penetra en el filtrado de dos maneras: por filtración a través de los glomérulos y por secreción de los túbulos. La mayor parte de la secreción de  $H^+$  se produce a través de la pared de túbulo proximal en intercambio por la reabsorción de  $Na^+$ . Este intercambio lo realiza un transportador denominado antiporte, debido a que mueve el  $Na^+$  y  $H^+$  en direcciones opuestas (1).

Dado que los riñones normalmente reabsorben casi todo el bicarbonato filtrado y excretan  $H^+$ , la orina normal contiene poco bicarbonato y es ligeramente ácida (un intervalo de pH entre 5 y 7).

#### ***Reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal***

Las membranas apicales de las células tubulares son impermeables al bicarbonato. La reabsorción de bicarbonato tiene que producirse de forma indirecta. Cuando la orina es ácida, el  $HCO_3^-$  se combina con el  $H^+$  para formar ácido carbónico. El ácido carbónico del filtrado se convierte entonces en  $CO_2$  y  $H_2O$ , en una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica. Esta enzima se encuentra en la membrana celular apical del túbulo proximal, en contacto con el filtrado (1).

El citoplasma de la célula tubular también contiene anhidrasa carbónica. Cuando aumentan las concentraciones de  $CO_2$  en el filtrado, el  $CO_2$  difunde al interior de las células tubulares. En el interior del citoplasma de la célula tubular, la anhidrasa carbónica cataliza la reacción en la cual el  $CO_2$  y el  $H_2O$  forman ácido carbónico. El ácido carbónico se disocia entonces en  $HCO_3^-$  y  $H^+$  en el interior de las células tubulares. El bicarbonato del interior de la célula tubular puede difundir entonces a través de la membrana basolateral y penetrar en la sangre. En condiciones normales, pasa la misma cantidad de  $HCO_3^-$  a la sangre de la que se eliminó del filtrado. El  $H^+$ , que se produjo al mismo tiempo que el  $HCO_3^-$  en el citoplasma de la célula tubular, puede retornar al filtrado o bien pasar a la sangre. En condiciones

de acidosis, casi la totalidad de  $H^+$  regresa al filtrado y se utiliza para ayudar a reabsorber todo el bicarbonato filtrado.

Durante la alcalosis, se agregan menos  $H^+$  al filtrado. Como la reabsorción del bicarbonato filtrado requiere que el  $HCO_3^-$  se combine con el  $H^+$  para formar ácido carbónico, se reabsorbe menos bicarbonato, que ayuda a compensar parcialmente la alcalosis (3).

### **1.1.5.- Secreción de hormonas**

Los riñones actúan también como glándulas endócrinas, ya que secretan al menos tres hormonas:

- 1) La 1,25-dihidroxitamina  $D_3$ , que es la forma activa de la vitamina  $D_3$  y que está involucrada en el metabolismo del calcio y el fósforo.
- 2) La eritropoyetina, que participa en el control de la producción de eritrocitos.
- 3) La renina, la cual es una enzima proteolítica que participa en el sistema renina angiotensina, catalizando la hidrólisis del angiotensinógeno en angiotensina I (4).

### **1.2.- FUNCIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

Durante mucho tiempo se pensó que la única función del endotelio vascular era separar la sangre de las estructuras adyacentes. Algunas de las funciones del endotelio vascular incluyen la regulación de la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea, la modulación del tono vascular, la regulación de la proliferación de las células de músculo liso y la capacidad de reclutar células sanguíneas, por lo tanto, las alteraciones fisiológicas del endotelio (disfunción endotelial) están implicadas en patologías como la aterosclerosis. En la disfunción endotelial el endotelio pierde sus características antiagregantes, anticoagulantes y fibrinolíticas, favoreciendo la formación de trombos y coágulos. Además, pierde sus efectos vasodilatadores originando vasoconstricción. Por otra parte, se favorece la adhesión de células inflamatorias y la proliferación de las células del músculo liso. Algunas de las causas de la disfunción endotelial son por infecciones, agentes oxidantes, hipercolesterolemia, turbulencias sanguíneas. Las

células endoteliales responden a agresiones de manera muy rápida en ocasiones, pero la respuesta endotelial suele ser a largo plazo mediante la modulación de la expresión génica de diversas proteínas involucradas en la adaptación funcional. Así, como resultado de la agresión al endotelio, disminuye la producción del óxido nítrico, de carácter vasodilatador, y se induce la síntesis de las endotelinas, proteínas de acción vasoconstrictora (5).

### 1.3.- REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Una de las principales funciones del riñón es la regulación de la presión arterial en cuyo mecanismo interviene el manejo de fluido y electrolitos. La teoría de la autorregulación defendida por Guyton y colaboradores explica que el riñón es capaz de mantener la presión arterial en valores normales, si se excreta el exceso de agua y sal que es consumida (Figura 4). Sin embargo, si el riñón ha perdido la capacidad de excretar la sal y el agua de manera normal, éste compensa el exceso de volumen aumentando la presión arterial, aumento que si es sostenido origina la aparición de hipertensión arterial (Figura 5).

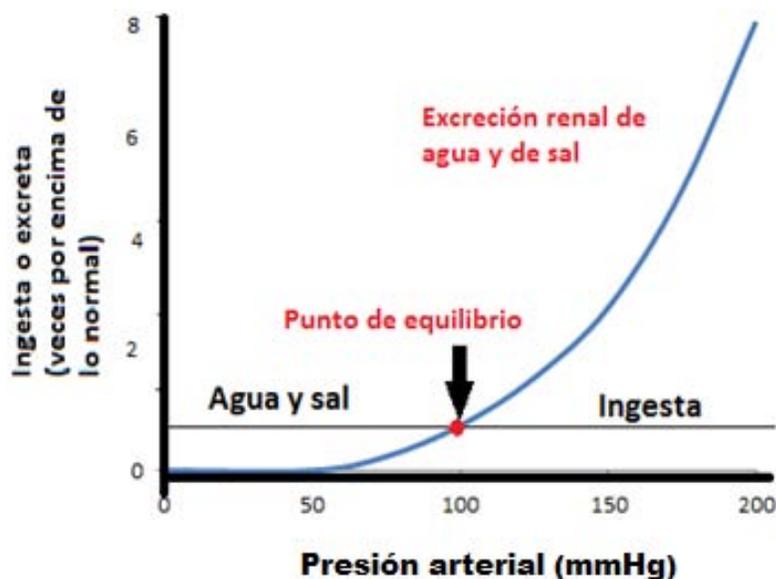
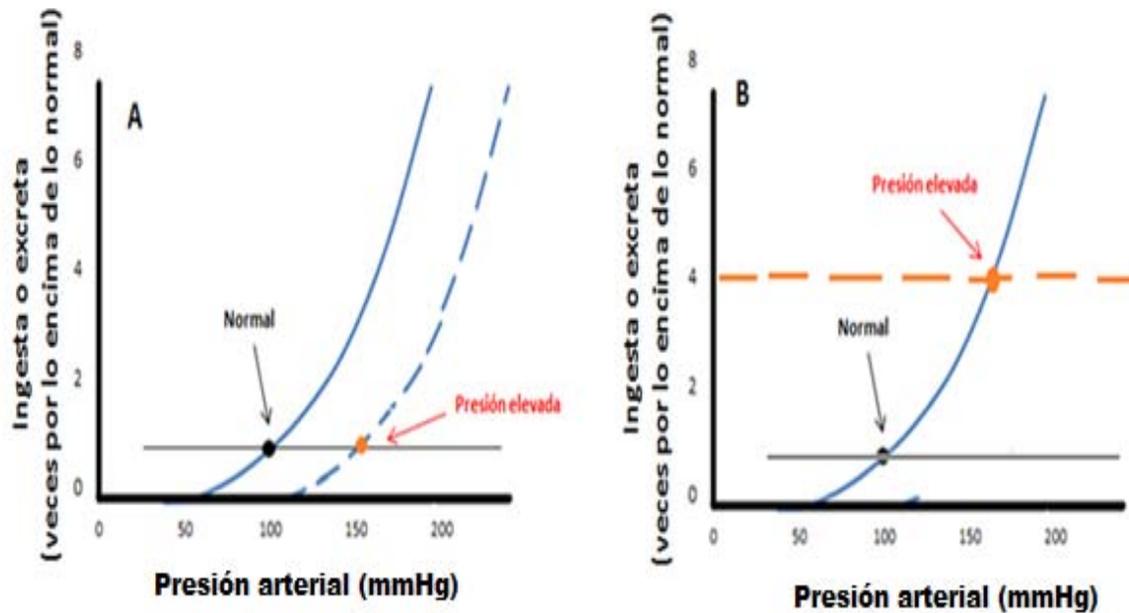


Figura 4.- Curva de natriuresis de presión que representa la teoría de la Autorregulación. Si la ingesta de sodio y agua es la misma, la presión arterial se regula y mantiene su punto de equilibrio (6).



**Figura 5. Curva de natriuresis de presión en la hipertensión arterial.** A) si hay algún cambio en la función renal, la curva de natriuresis se desplaza a un nivel de presión más alta mientras que B), si se aumenta la ingesta de sodio y agua puede modificar la presión arterial. En este caso, el nivel de ingesta aumentó 4 veces y el punto de equilibrio se desplazó a un nivel de presión más alto. El punto de equilibrio describe el nivel al que se regulará la presión arterial (6).

### 1.3.1.- Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es una cascada enzimática-hormonal, que regula la función cardiovascular, adrenal y renal; controlando el balance hidroelectrolítico y la presión arterial. El sistema puede activarse cuando hay pérdida de volumen de sangre, o una caída en la presión sanguínea.

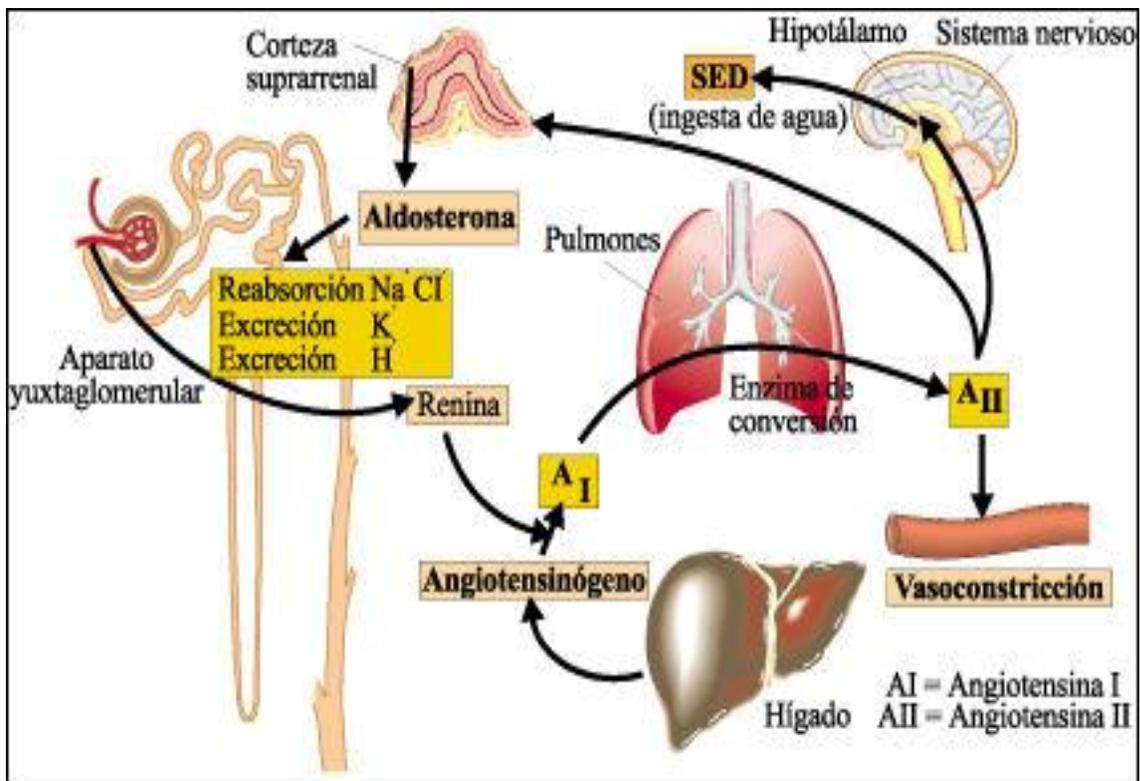
Esta cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, en que la renina, una aspartil proteasa de naturaleza glicoproteica, sintetizada en el aparato yuxtaglomerular, es liberada durante estados hipovolémicos e hipotensión (7). La secreción de renina, está controlada por: a) la mácula densa (células modificadas del túbulo contorneado distal), varía dependiendo de la concentración

de NaCl del flujo sanguíneo; b) el barorreceptor intrarrenal sensible a las variaciones en la presión sanguínea en la arteriola aferente, donde el incremento o la disminución de la presión arterial, inhibe o estimula la liberación de renina y c) los receptores  $\beta$  adrenérgicos, los cuales involucran la liberación de norepinefrina de las terminales nerviosas postganglionares simpáticas, ubicados en las células yuxtaglomerulares, con la consecuente liberación de renina. La renina liberada corta al angiotensinógeno, sintetizado en el hígado, para dar lugar al decapeptido, angiotensina I (Ang I), el cual no tiene actividad biológica. Por medio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una glicoproteína de 135 kDa, la Ang I es hidrolizada, para dar lugar a la angiotensina II (Ang II), un octapéptido, biológicamente activo (8), el cual a través de los receptores de Angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>) y tipo 2 (AT<sub>2</sub>), promueve sus acciones biológicas. El receptor AT<sub>1</sub> es un receptor de siete dominios transmembrana, perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteína G (9), el cual está acoplado positivamente a la proteína cinasa C, y negativamente a la adenil ciclasa, mediante las proteínas G <sub>$\alpha$ q</sub> y G <sub>$\alpha$ i</sub> (10), la Ang II a través de estos receptores produce vasoconstricción, reabsorción renal de sodio, proliferación, diferenciación y crecimiento celular, estimulación de la secreción de aldosterona, incremento de la actividad del sistema nervioso simpático, estimulación de la sed y del apetito por la sal (11). La Ang II, también se une a otro receptor, el AT<sub>2</sub>, otro receptor de siete dominios transmembrana, que muestra una secuencia con 34 % de homología con AT<sub>1</sub>. El receptor AT<sub>2</sub> muestra su mayor expresión durante el desarrollo fetal, descendiendo sus niveles en el nacimiento (9). La vía de señalización de este receptor, involucra proteínas G; ya que el receptor está acoplado a una proteína G <sub>$\alpha$ 2</sub> y G <sub>$\alpha$ 3</sub> (12), así mismo, la estimulación del receptor AT<sub>2</sub>, activa fosfatasa de fosfotirosina, especialmente la fosfatasa 2A de serina/ treonina, fosfatasa de proteína cinasas, lo cual resulta en la inactivación de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (13). Las acciones de la Ang II mediadas por este receptor, son generalmente opuestas a las obtenidas por el receptor AT<sub>1</sub>, ya que su activación provoca vasodilatación, inhibición de la proliferación celular y de la apoptosis.

### 1.3.2.- Angiotensina II

La angiotensina II, se encuentra en concentraciones mil veces superior en el fluido intersticial renal con respecto al plasma; lo cual ha llevado a aceptar que la mayoría de la Ang II renal es formada dentro del riñón (13). Por otra parte, se ha descrito la ubicación de los receptores de la Ang II, en las arteriolas renales, células mesangiales glomerulares y sobre la membrana basal y apical de las células del túbulo proximal; demostrando que los receptores AT<sub>1</sub> están ampliamente distribuidos en las células musculares lisas de las arteriolas aferentes y eferentes, células mesangiales, borde en cepillo y membrana basolateral de las células del túbulo proximal, epitelio de la porción ascendente delgada de la asa de Henle, túbulo distal, conducto colector, podocitos y en la células de la mácula densa, sugiriendo que la Ang II puede regular las funciones en cada uno de los segmentos renales, ante diversas situaciones fisiológicas o patológicas (14). Entre las acciones renales que ejerce la Ang II, se encuentran la vasoconstricción, tanto de la arteriola aferente como la eferente; contracción de las células mesangiales, lo cual ocasiona una reducción del flujo sanguíneo renal, de la tasa de filtración glomerular y de la carga de sodio filtrado.

La ECA-2 fue descrita inicialmente, como la enzima responsable de la hidrólisis de la Ang I, para generar Ang-(1-9) (15, 16). Sin embargo estudios más recientes revelan que la ECA-2 también es capaz de metabolizar a la Ang II, con alto grado de eficiencia catalítica, para formar a la Ang-(1-7) (Figura 6) (17, 18); por lo tanto la ECA-2 disminuye la concentración del péptido vasocontráctil Ang II y aumenta la del vaso relajante Ang-(1-7); indicando su papel como una enzima antihipertensiva. Bajo condiciones fisiológicas, la ECA-2 se expresa en una amplia variedad de tejidos, órganos y especies; se ha identificado en corazón, testículos, pulmones, hígado, sistema nervioso central, placenta y riñón de ratones, ratas y humanos (19-23); siendo el riñón, el órgano que tiene mayor expresión de ECA-2 en ratas (24).

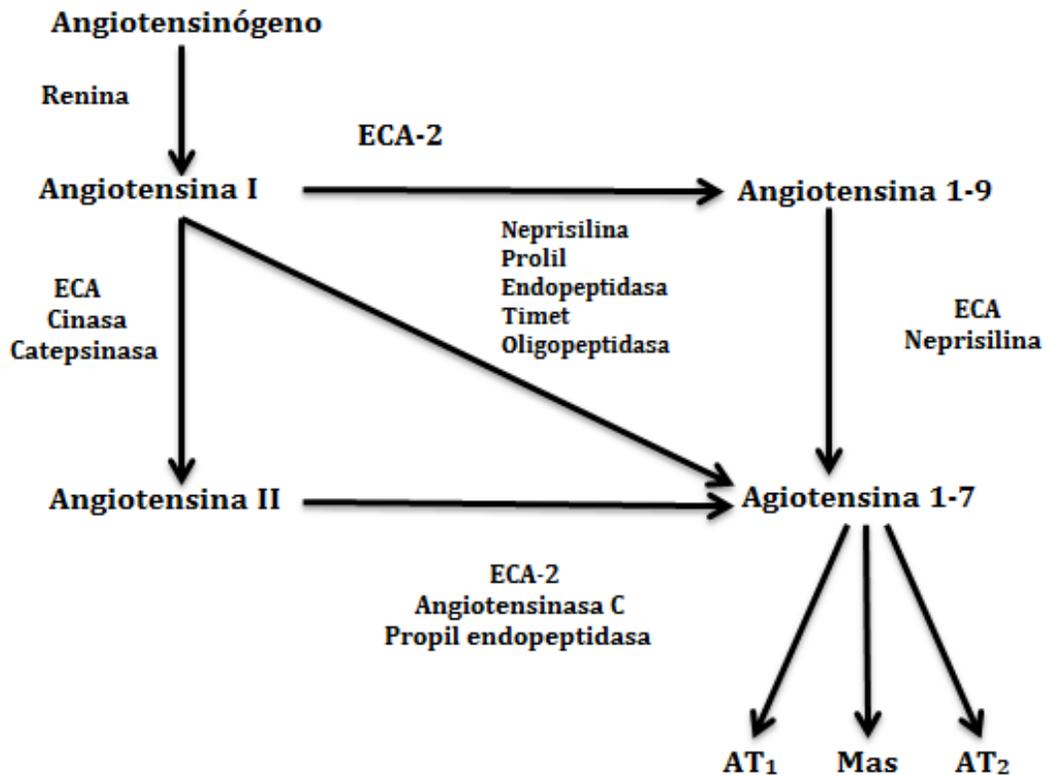


**Figura 6.- Representación gráfica del Sistema Renina Angiotensina y de los órganos participantes.** La renina actúa sobre el angiotensinógeno siendo este el sustrato de la renina produciendo ang I en el hígado. La ang I no posee efecto fisiológico, pero al pasar a través de los pulmones, la ECA transforma la ang I en Ang II, la cual es un potente vasoconstrictor y regulador de sodio, como también es el estímulo primario para la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal. La aldosterona es un mineral corticoide que produce la reabsorción de agua y sodio por los túbulos renales (25).

### 1.3.3.- Angiotensina-(1-7)

Entre los mediadores del SRAA, el heptapéptido Ang-(1-7), es de particular interés, ya que sus acciones fisiológicas son distintas a las ejercidas por la Ang II, a través del receptor  $AT_1$  (26, 27). Se ha demostrado en el riñón la presencia de todos los componentes necesarios para la producción de Ang-(1-7) y se ha detectado a la enzima convertidora de Ang II tipo 2 (ECA-2), a la Ang-(1-7) y  $AT_1$  en los túbulos proximales (28, 29), sugiriendo que la Ang-(1-7) es sintetizada en el riñón y ejerce sus efectos a este nivel.

La Ang-(1-7), es conocida desde la década de los 80 pero por mucho tiempo fue considerado como un producto inactivo del SRAA (30). Sin embargo, este concepto comenzó a cambiar al final de los 80 con los estudios de Schiavone y col (22), quienes demostraron que la Ang-(1-7) era equipotente a la Ang II en liberar vasopresina *in vivo* y con los estudios de Campagnole-Santos y col (31), quienes reportaron que la administración de Ang-(1-7) en el núcleo del tracto solitario ocasionaba una disminución de la presión arterial en ratas, demostrando la importancia de la Ang-(1-7) como un integrante biológicamente activo del SRAA. La Ang-(1-7) puede ser sintetizada a partir de la Ang I, Ang II o Ang-(1-9) (Figura 7). La síntesis de la Ang-(1-7) a partir de la Ang I requiere de las endopeptidasas tisulares denominadas neprisilina, prolil endopeptidasa y timetoligopeptidasa (32). La conversión de Ang II en Ang-(1-7) es catalizada por la prolilcarboxipeptidasa (angiotensinasa C) y por la prolilendopeptidasa (33). La obtención de Ang-(1-7) a partir de Ang-(1-9), es mediada por la neprisilina y por la ECA. Así mismo, la Ang-(1-7) se puede formar por la acción de ECA-2 a partir de la AngII o de la AngI (15); siendo la conversión de la Ang II a la Ang-(1-7) la vía preferida, con una eficiencia de 500 veces superior que a partir de Ang I. La Ang-(1-7) se une al receptor AT<sub>2</sub> y al recientemente descrito receptor Mas (34).



**Figura 7.- Principales participantes del sistema renina angiotensina.** En el diagrama se muestran los péptidos que fungen como sustratos, las enzimas participantes en el SRAA así como los productos de cada reacción (7).

### 1.3.4.- Receptor Mas

El protooncogén Mas se detectó por primera vez *in vivo* por sus propiedades tumorigénicas, el gen se expresa predominantemente en los testículos, en algunas áreas del cerebro y en menores niveles pero detectables en el riñón y corazón (35). Se ha demostrado que la eliminación genética del receptor acoplado a la proteína G codificada por el protooncogén Mas suprime la unión de Ang-(1-7) en riñones de ratón. En consecuencia, los ratones deficientes del receptor MAS carecen por completo de la acción antidiurética de Ang-(1-7) después de una carga aguda de agua. La Ang-(1-7) se une a las células transfectadas con MAS y provoca la liberación de ácido araquidónico. Por otra parte, las aortas pierden su relajación inducida por la Ang-(1-7). En conjunto, estos resultados identifican a Mas como un receptor funcional para Ang-(1-7) y proporcionan una base

molecular clara para las acciones fisiológicas de este péptido biológicamente activo (34).

#### **1.4.-ÓXIDO NÍTRICO**

El óxido nítrico (NO) es una molécula que actúa como un mensajero intracelular y transcelular; de ella se empezó a hablar en 1980, gracias a los estudios realizados por Furchgott y Zawadzki quienes inicialmente la denominaron factor relajante derivado del endotelio (36-38). El NO es un gas que modula varias funciones incluyendo la relajación del músculo liso, la regulación de la presión arterial, la neurotransmisión, la citotoxicidad celular inmune y algunos mecanismos de acción de agentes anestésicos. Se ha sugerido que el NO desempeña un papel fundamental en la isquemia de la falla renal aguda (IARF).

- Reducción en la síntesis de la L-arginina lo que origina la disminución de NO. La L-arginina es clasificada como un aminoácido semiesencial. Hay producción de arginina en el hígado, la cual es inmediatamente utilizada en el ciclo de la urea (39). La arginina sintetizada en el túbulo proximal de la corteza renal es la mayor fuente endógena para distribución en todo el cuerpo (40). Además cabe mencionar que el riñón reabsorbe a nivel de túbulo proximal, la L-arginina filtrada, por lo que en pacientes con falla renal se pierde este mecanismo (41, 42).
- Competencia por el metabolismo de L-arginina. El riñón contiene cantidades significativas de arginasa II (isoforma mitocondrial), mientras que las células endoteliales contienen arginasa I (isoforma citosólica) y arginasa II, existiendo evidencia de que las arginasas tanto renal como vascular compiten con la NOS por la L-arginina limitando la producción de NO (41, 43). Existe evidencia que el uso de inhibidores de arginasas restauran la síntesis de NO endotelial y aminoran el daño renal en modelos de nefrectomía 5/6 (44).

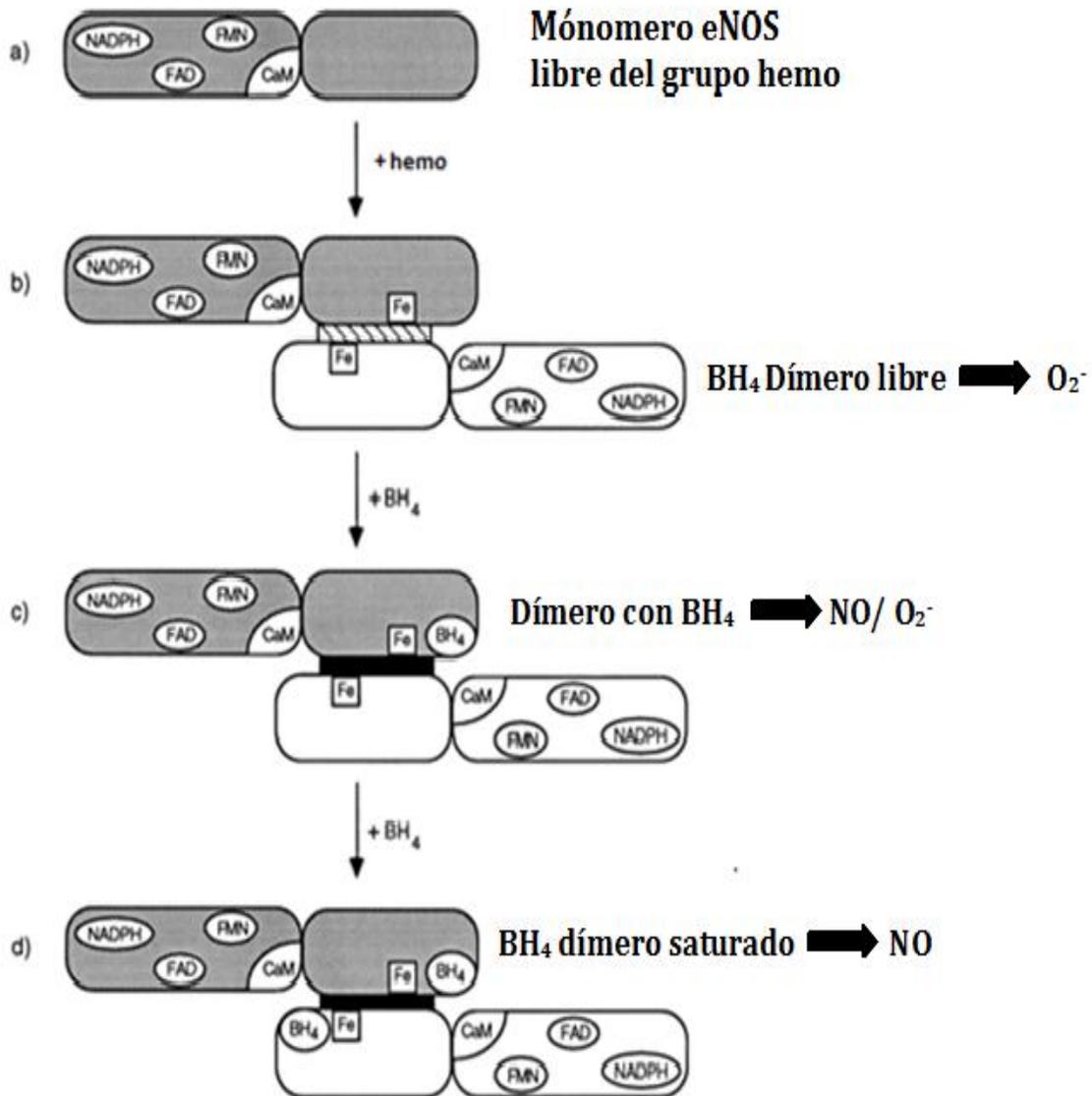
Cualquiera de estos eventos, solos o en conjunto conlleva a la reducción de NO.

El NO se produce durante la conversión de la L-arginina a la L-citrulina por la acción de la sintasa del óxido nítrico (NOS). Esta enzima se expresa en tres

isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS), e inducible (iNOS). La eNOS ha sido localizada en células endoteliales de la vasculatura, incluyendo los glomérulos, arteriolas y túbulos (45). La nNOS se expresa ampliamente en las células de la mácula densa del aparato yuxtaglomerular, en la cápsula de Bowman, en la arteriola eferente y el túbulo colector (46). La iNOS se expresa en células del músculo liso vascular, células mesangiales, células intersticiales del túbulo proximal, distal, colector y nervios renales (47).

#### **1.4.1.-Sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS)**

La eNOS es un dímero formado por dos monómeros idénticos de 134 kDa. La enzima eNOS únicamente es funcional en su forma dimérica. La dimerización comienza con la unión del grupo hemo (48), sin el cual la enzima solo puede existir en su estado monomérico. La unión del grupo hemo a la enzima y con ello la formación del dímero es posible por la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), la cual se une al dímero para estabilizarlo (49). El monómero de la eNOS tiene dos dominios funcionalmente distintos, un dominio oxigenasa en el extremo amino, el cual contiene el sitio catalítico y un segundo dominio reductasa en el extremo carboxilo. El dominio reductasa posee los sitios de unión para NADPH, donde las flavinas catalizan la formación de FAD a FMN y para calmodulina (CaM), este dominio transfiere los electrones con ayuda de las flavinas hacia el grupo hemo unido al dominio oxigenasa. El dominio oxigenasa contiene los sitios de unión para la L-arginina y la  $BH_4$ , puede unir  $O_2$  y catalizar el siguiente paso. La primera etapa de la síntesis de NO es la hidroxilación de la L-arginina para producir  $N^G$ -hidroxi-L-arginina, durante la segunda etapa éste compuesto intermediario es oxidado para dar como resultado L-citrulina y NO, este proceso es catalizado por el dominio oxigenasa (50, 51). La eNOS sin  $BH_4$  es incapaz de producir NO y en su lugar produce anión superóxido  $O_2^-$  (Figura 8).



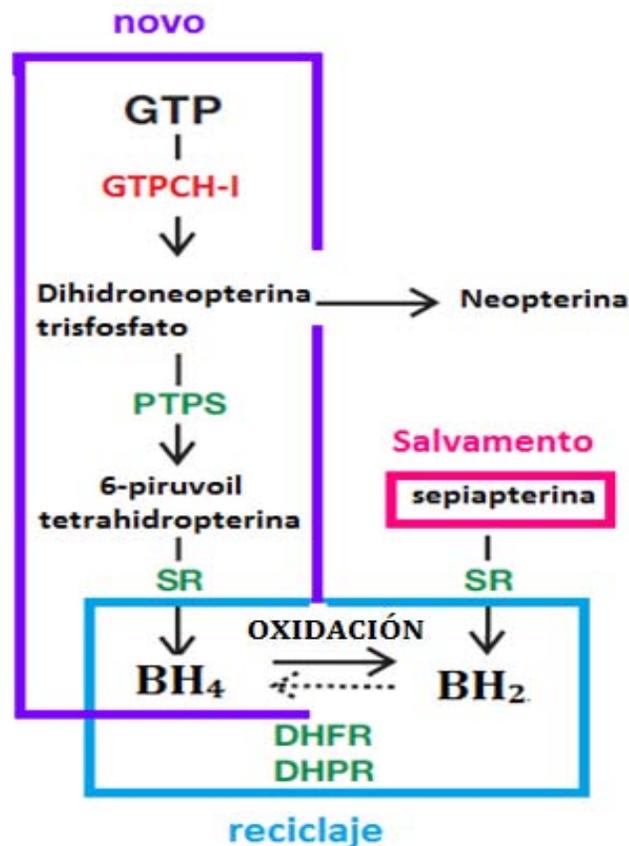
**Figura 8.- Etapas del acople del dímero de la NOS.** a) Monómero eNOS libre del grupo hemo; b) asociados con la presencia del grupo hemo para formar un dímero con actividad de NADPH oxidasa; c) Los niveles bajos de BH<sub>4</sub> conducen a la formación de un dímero estable (indicado por la barra de color negro) que cataliza la producción simultánea de NO y O<sub>2</sub><sup>-</sup>; d) con altos niveles de BH<sub>4</sub>, la enzima actúa exclusivamente produciendo NO (52).

#### 1.4.2.- Biosíntesis y metabolismo de la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)

La BH<sub>4</sub> no se oxida por el derivado de la dihidrobiopterina (BH<sub>2</sub>), durante el ciclo catalítico de la NOS se forma un radical BH<sub>3</sub><sup>+</sup> en la que BH<sub>4</sub> es regenerada directamente. Los niveles Intracelulares de BH<sub>4</sub> están regulados a través de la síntesis *de novo* de BH<sub>4</sub>. La BH<sub>4</sub> se sintetiza a partir de trifosfato de guanosina

(GTP) por las enzimas GTP ciclohidrolasa I (GTPCH-I), 6-piruvoil-tetrahidrobiopterina sintasa (PTPS) y sepiapterina reductasa (SR). La BH<sub>4</sub> es susceptible a la oxidación por el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y otras especies reactivas como el peroxinitrito, formando dihidrobiopterina (BH<sub>2</sub>) y en última instancia biopterina (53).

La síntesis de BH<sub>4</sub> también es posible a través de la vía de salvamento, en donde la sepiapterina exógena o proveniente de alguna otra ruta metabólica se metaboliza a dihidrobiopterina por la sepiapterina reductasa (SR) y de ahí a BH<sub>4</sub> por la dihidrofolato reductasa (DHFR) cuando los niveles de BH<sub>2</sub> son suprafisiológicos. La regeneración o reciclaje de la BH<sub>2</sub> a BH<sub>4</sub> también es facilitada por la dihidropteridina reductasa (DHPR) (Figura 9).



**Figura 9.- Vías de síntesis de la BH<sub>4</sub>.** La síntesis de *novo* a partir de GTP para la generación de BH<sub>4</sub> por la dihidropterina reductasa a través de una ruta de regeneración de pterinas. La ruta de reciclaje del cofactor en su forma de BH<sub>2</sub> es oxidada por la DHFR. La ruta de salvamento a partir de la sepiapterina es metabolizada por SR a BH<sub>2</sub>, posteriormente reducida por la DHFR para la generación de BH<sub>4</sub> (53).

### **1.4.3.- Papel protector del NO derivado de eNOS**

El NO derivado del endotelio es a menudo considerado como agente protector (54) debido a que mantiene la función e integridad del endotelio vascular. Dado que las enfermedades crónico-degenerativas como la hipertensión arterial (55), aterosclerosis (56), hipercolesterolemia (57) ó en una condición de hipoxia afectan de manera importante la función endotelial, una estrategia terapéutica ha sido encontrar los mecanismos que permitan mantener la concentración fisiológica de NO. En modelos con insuficiencia renal crónica se ha reportado que, la inhibición crónica de la NOS agrava el daño renal y que, la disminución en la producción de NO se asocia con incremento en la presión glomerular y daño endotelial, favoreciendo la progresión de la patología (58, 59).

### **1.5.- INSUFICIENCIA RENAL**

Es el término que se le atribuye a la incapacidad del riñón de filtrar toxinas de la sangre y se diagnostica por una elevación de la creatinina plasmática. La patología puede provocar hipertensión arterial, que se debe fundamentalmente a la retención de sal, agua y concentraciones plasmáticas elevadas de urea (uremia). De acuerdo al tiempo de progresión, la enfermedad se puede dividir en dos tipos: insuficiencia renal crónica (IRC) e insuficiencia renal aguda (IRA).

La IRC se define como la pérdida progresiva, generalmente irreversible de la filtración glomerular que se traduce en un conjunto de síntomas y signos denominado.

#### **1.5.1.- Insuficiencia renal aguda**

La IRA se define como la disminución rápida de la filtración glomerular en horas o días, provocando la retención de productos de desechos nitrogenados, alteración del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-básico (60).

##### **1.5.1.1.- Clasificación Etiológica**

Desde el punto de vista fisiopatológico el daño renal puede producirse por diferentes factores:

### a) Prerenal o Funcional

Las causas más frecuente son:

- ✓ Hipovolemia: Hemorragias (gastrointestinales, quirúrgicas, posparto); digestivas (vómito, diarreas); Pérdidas renales (diuréticos, cetoacidosis diabética, diabetes insípida).
- ✓ Disminución del gasto cardiaco: Insuficiencia cardiaca aguda (infarto, arritmias); embolia pulmonar masiva; hipertensión pulmonar.
- ✓ Vasodilatación periférica: Sepsis, anafilaxia, antihipertensivos, anestesia.
- ✓ Vasoconstricción renal: Hipercalemia, norepinefrina, ciclosporina, anfotericina B.
- ✓ Alteración de las respuestas autorreguladoras renales: Inhibidores de las prostaglandinas, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES); inhibidores de la ECA.

b) **Intrínseco:** Es un daño en la estructura anatómica, primordialmente glomérulos, túbulos y vasos renales se puede clasificar por:

- ✓ Necrosis tubular aguda (NTA): Lesión de lo túbulos renales por mecanismos isquémicos o tóxicos.
- ✓ Lesión glomerular: Glomerulonefritis agudas y rápidamente progresivas, hipertensión maligna, síndrome hemolítico-urémico, preeclampsia, esclerodermia.
- ✓ Lesión tubulointerticial: Reacciones alérgicas a fármacos (antibióticos, AINES, diuréticos), infecciones (*Leptospira*, *Citamegalovirus*, *Cándida*).
- ✓ Lesión de arterias o venas renales: Obstrucción de arterias renales (trombosis, embolia); Obstrucción de venas renales (trombosis, compresión).

c) **Postrenal u obstructiva:** Las causas son lesiones que produzcan un obstáculo en la vía urinaria que impida la salida de la orina formada, provocando un aumento de presión.

- ✓ Obstáculo en los uréteres-pelvis: Tumores o fibrosis.
- ✓ Vejiga: Coágulos, tumores, prostatismo, vejiga neurógena.
- ✓ Uretra: Estenosis, fimosis.
- ✓ Lesiones intrarrenales: Depósito de cristales, coágulos, cilindros.

La obstrucción debe ser grave, prolongada y que afecte al tracto urinario distal (meato uretral externo, cuello de la vejiga) o bien a los uréteres de manera bilateral o unilateral en pacientes con un único riñón (61).

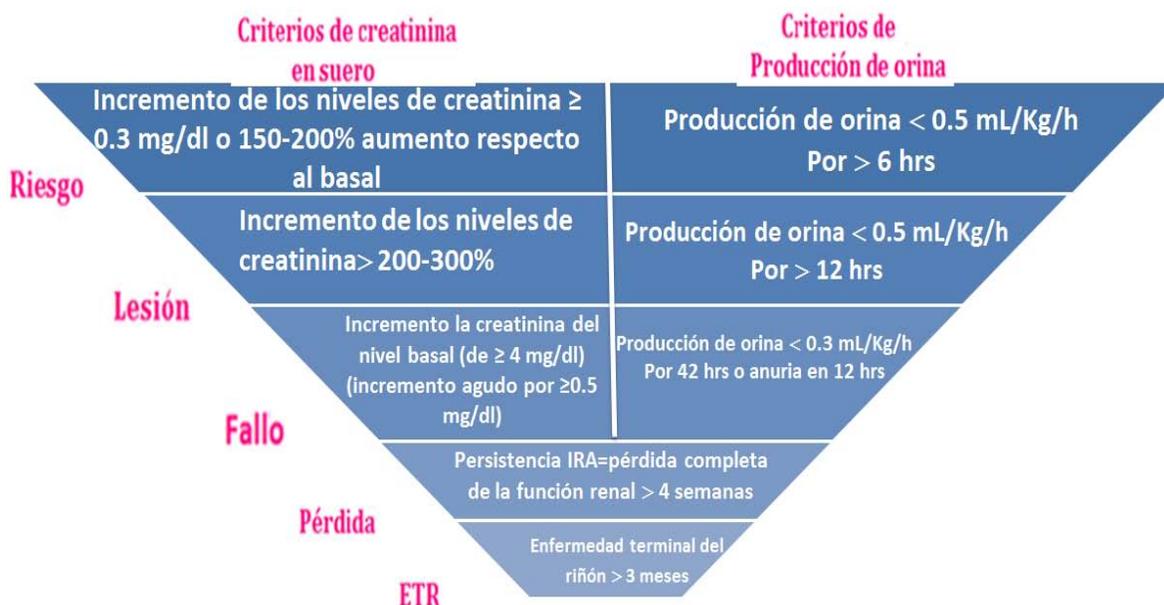
### ***1.5.2.- Criterios de clasificación que describen la gravedad de la lesión renal aguda.***

Casi todas las definiciones de IRA tienen como elementos comunes de diagnóstico, el uso de la creatinina sérica y la producción de orina porque son determinadas rutinariamente de fácil medición y que son específicas del riñón. Es importante la medición del aclaramiento de creatinina para determinar la relación entre la tasa de filtración glomerular, la secreción de creatinina y la creatinina sérica (62, 63). Para fines clínicos es importante determinar si la función renal es estable, empeora o mejora. Esto por lo general se puede determinar mediante el control de la creatinina sérica sola (64). El grado de los cambios de creatinina en suero refleja el cambio en la FG. Por otro la producción de orina como signo diagnóstico es mucho menos específica, excepto cuando está gravemente disminuida o ausente. La IRA puede existir a pesar de la producción de orina normal (no oliguria), pero los cambios en la producción de orina pueden ocurrir mucho tiempo antes que los cambios bioquímicos sean evidentes.

Para ello se debe considerar una clasificación IRA para detectar pacientes en los que se encuentra ligeramente afectada la función renal y pacientes en los que la función renal se ve afectada notablemente.

El sistema de referencia más utilizado es el criterio conocido, por sus siglas en inglés, como RIFLE; Risk, Injury, Failure, Loss y End-stage kidney disease (riesgo,

lesión, fallo, pérdida y enfermedad terminal del riñón). Las siglas RIFLE describen tres etapas de gravedad de la IRA (riesgo, lesión y fallo) (Figura 10). Las características únicas de la clasificación RIFLE incluye la presencia de 3 variables para describir la gravedad de la disfunción renal basado en el nivel sérico de creatinina, los cambios de la FG o su duración y la gravedad de la producción reducida de orina.



**Figura 10.- Criterio RIFLE.** Son variables que integran la escala RIFLE (del acrónimo riesgo, lesión, falla, pérdida, enfermedad renal terminal en base a la creatinina en suero y producción de orina (65).

Siendo la IRA un proceso grave pero reversible, se ha buscado tener moléculas que funcionen como biomarcadores de daño temprano que permitan identificar el daño de manera inicial para revertirlo antes de que se observen alteraciones metabólicas y posteriormente impedir que evolucione a IRC.

En un estudio presentado por Méndez Duran en el 2010, titulado la “Epidemiología de la Insuficiencia Renal en México” se hace mención que no existe un registro real de la tasa de pacientes con dicho padecimiento, pero que una incidencia estimada de pacientes con IRC es de 377 casos por millón. Es necesario contar con un programa de detección oportuna para de la IRC, que permitan desacelerar la incidencia de pacientes en terapias sustitutivas (66).

## **1.6.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y LA RELACIÓN CON LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA**

La patogénesis de la hipertensión arterial en la falla renal es multifactorial. Cuando la función renal disminuye, se produce un incremento paralelo en la excreción de sodio por la nefrona relacionado con la disminución de nefronas funcionales. Este incremento se ha atribuido a un aumento de la secreción de factores natriuréticos circulantes que inhiben la reabsorción distal de sodio (67). La disminución de las nefronas funcionales conlleva a daño glomerular asociado con hipertensión arterial (68).

Pueden haber factores que favorecen el mantenimiento o el desarrollo de la hipertensión arterial en presencia de la insuficiencia renal como:

- a) Déficit de NO. La síntesis de NO puede ser bloqueada por la inhibición de la actividad de eNOS por análogos de L-arginina, tales como dimetil-arginina asimétrica (ADMA) (69, 70). Existe evidencia de que en la insuficiencia renal hay un incremento en los niveles de ADMA, teniendo un papel importante en la patogénesis de la hipertensión arterial relacionada con el daño vascular.
- b) Activación del SRAA: La Ang II tiene receptores  $AT_1$  renales expresados en arteriolas tanto aferentes como eferentes, en el glomérulo y en el túbulo proximal. Los receptores  $AT_1$  regulan la vasoconstricción, la reabsorción de sodio y agua, también promueven la hipertrofia y proliferación celular (71). En modelos con falla IRA los niveles de Ang II se encuentran aumentados favoreciéndose así el efecto vasoconstrictor contribuyendo a la patogénesis de la hipertensión arterial en el daño renal (72).

## **2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar de que los pacientes que han cursado por un evento de insuficiencia renal aguda, clínicamente se recuperen, existe una alta probabilidad de que progresen a enfermedad renal crónica con el paso del tiempo y los mecanismos que promueven la progresión no han sido entendidos en su totalidad. Cuando se progresa a enfermedad renal crónica la necesidad de diálisis es imperativa y por ende el costo para los servicios de salud hace imposible el tratamiento para toda la población afectada.

En el modelo experimental de enfermedad renal aguda secundario a la nefrectomía 5/6, sólo 1/6 del riñón se encuentra funcionando. En pocas horas posteriores a la cirugía, la función del riñón se va deteriorando a causa de la sobrecarga de presión que se concentra en esta porción del riñón para mantener la homeostasis renal (hemodinámica y neuro-humoral). Si identificamos los cambios tempranos ocurridos a nivel endotelial, entendidos como la disminución en la producción del NO o el aumento de la actividad del SRAA se podría implementar una terapia dirigida que ayude a preservar la función del endotelio y consecuentemente, la función renal.

## **3.-HIPÓTESIS**

El modelo experimental en ratas macho con enfermedad renal secundaria a la nefrectomía 5/6 disminuye la producción de NO como consecuencia de la disfunción en la actividad catalítica de la NOS por desacople de la misma y aumento en la actividad del SRAA, provocando un temprano incremento en la presión arterial.

## **4.-OBJETIVOS**

### **4.1.-Objetivo general**

Estudiar el papel de la sintasa del óxido nítrico endotelial y su acople en el daño renal agudo en ratas macho.

### **4.2.-Objetivos particulares**

- I. Estandarizar la generación de IRA en un modelo experimental animal.
  
- II. Estudiar la participación de la eNOS con respecto a la hipertensión arterial en el modelo de nefrectomía 5/6 mediante la:
  - a) Expresión proteica del monómero eNOS.
  - b) Evaluación de la producción de NO, BH<sub>4</sub>, BH<sub>2</sub> por electroforesis capilar.
  - c) Evaluación de la actividad de la eNOS.
  
- III. Evaluar la producción y actividad de Ang II y -(1-7) en el modelo de nefrectomía 5/6 mediante la:
  - a) Determinación de la producción de Ang II y Ang-(1-7) por electroforesis capilar.
  - b) Expresión de los receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y MAS.

## 5.-DISEÑO EXPERIMENTAL

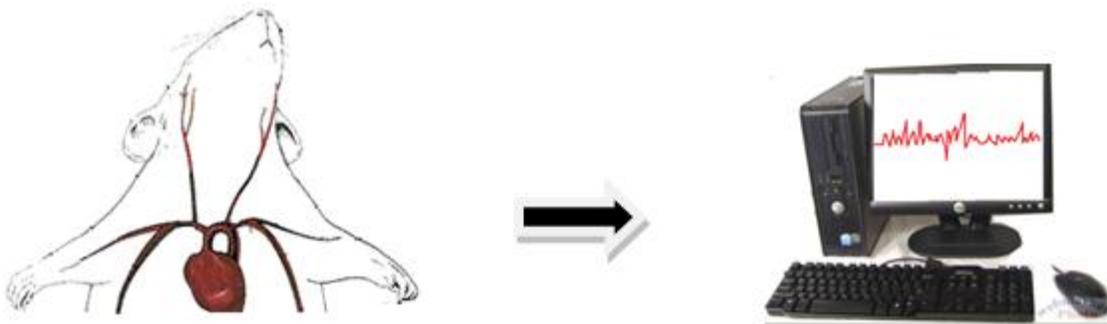
Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal de  $300 \pm 20$ , de 2-3 meses de edad obtenidas del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Las ratas se mantuvieron con libre acceso a alimento estándar LabDiet 5001 (ANEXO 1) y agua, bajo condiciones de temperatura ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (35 %) y ciclos de luz-oscuridad 07:00 a 19:00 (12 hrs) controlados. Los animales se trataron bajo las normas establecidas por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología. Los sujetos fueron divididos en dos grupos experimentales: un grupo "sham" o falsamente nefrectomizado y un grupo sometido a NFX 5/6. El grupo de NFX 5/6 se subdividió en 4 subgrupos con diferentes tiempos de isquemia: 30, 60 o 90 minutos. Al final de cada tiempo de isquemia, los animales fueron sacrificados para obtener muestras de riñón y orina los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar las siguientes determinaciones: expresión proteica y actividad de eNOS, cuantificación de  $\text{BH}_2$ ,  $\text{BH}_4$ , Ang II, Ang-(1-7) y expresión proteica de los receptores  $\text{AT}_1$ ,  $\text{AT}_2$  y MAS.

## 6.- MATERIALES y MÉTODOS

### 6.1.-Registro de la presión arterial intracarotidea

#### Descripción del método

Los sujetos experimentales de cada grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico (63 mg/Kg, i.p.). Posterior a la anestesia se procedió a disecar a nivel del cuello, el músculo esternocleidomastoideo para realizar una traqueostomía. El objetivo de realizar una traqueostomía fue preservar la vía aérea permitiendo una adecuada función respiratoria durante todo el proceso quirúrgico. Para la canulación de la arteria carótida ésta se disecó, se limpió del tejido conectivo y se refirió con dos hilos de seda 3-0. El flujo sanguíneo se interrumpió por la oclusión de la arteria, proximal al corazón con una pinza y el lado distal se ligó definitivamente con un hilo de seda. Se realizó un pequeño corte transversal en la arteria, cerca al extremo ligado para introducir la cánula y esta se ligó con el segundo hilo. La cánula, conteniendo solución salina heparinizada (10 U/mL), se conectó a un transductor de presión (Edwards), conectado a un equipo de adquisición de datos (Duo 18, WPI) y éste a su vez a un equipo de cómputo (Figura 11).

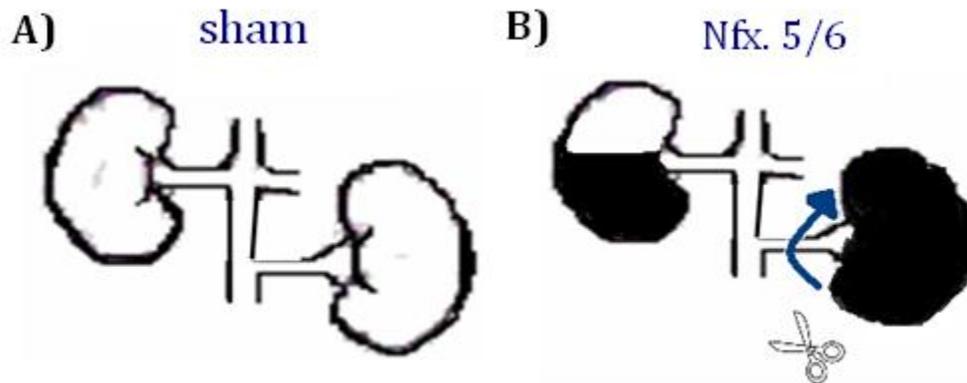


**Figura 11.- Representación gráfica de la localización de la arteria carótida en rata para determinar la presión arterial con un sistema computarizado de adquisición de datos.**

## 6.2.-Nefrectomia 5/6

### Descripción del método

En las ratas previamente anestesiadas e instrumentadas para la medición de la presión arterial, se procedió a rasurar el abdomen y se realizó asepsia en la zona abdominal con Isodine. Posteriormente, se realizó una incisión en la región abdominal media de aproximadamente 3 cm, sujetando la piel y el músculo con las pinzas separadoras, se expusieron los intestinos y el riñón derecho, identificando en él la arteria renal, posteriormente se disecaron sus ramas y se ligaron dos arterias para interrumpir el flujo en dos terceras partes de ese riñón. Posteriormente, se localizó el riñón izquierdo, se disecó el paquete vascular completo y se interrumpió el flujo con una pinza hemostática. Se ligó definitivamente el extremo proximal con hilo de seda (3-0) y se llevó a cabo resección, por lo cual se tuvo 1/6 de la masa renal funcional (Figura 12).



**Figura 12.- Esquema representativo de la masa funcional y tejido renal isquémico.**

A) Riñones completamente perfundidos de una rata control (sham); B) La zona oscura de los riñones representa el tejido renal isquémico (riñón derecho) y el tejido removido (riñón izquierdo).

### **6.3.-Homogenización de muestras para western blot**

#### **Descripción del Método**

- 1) El riñón derecho obtenido de las ratas de los diferentes grupos experimentales se colocaron en una solución salina fisiológica fría, se lavaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento. Al tejido se le agregó solución amortiguadora de homogenización conteniendo un coctail de inhibidores de proteasas (25 % peso del tejido/volumen de la solución amortiguadora), se homogenizó con Polytron a 30000 rpm por 20 segundos cada muestra y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (73).

### **6.4.-Cuantificación de proteínas por el método de Lowry**

#### **Fundamento**

Consta de dos etapas:

- 1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas en los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos, formando complejos. Estos complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína, de un color azul pálido, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo hacia la superficie a los residuos fenólicos de tirosina, que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reacción de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presente en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los residuos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (73).

## **Descripción del Método**

La curva estándar consiste en albúmina sérica bovina a las concentraciones 0, 5, 10, 15, 25, 35 y 50  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{L}$ .

En tubos de ensayo, se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra diluida (1:100) más 1 mL de solución A, se agitó vigorosamente y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua bidestilada. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente después se determinaron las absorbancias con ayuda de un espectrofotómetro a 750 nm de longitud de onda.

## **6.5.-Evaluación de la expresión proteica**

### **Descripción del método**

Previa cuantificación de la concentración proteica de los riñones homogenados, se tomó el volumen del homogenado equivalente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína y se le agregó un volumen igual de solución amortiguadora de carga 2X, se mezcló perfectamente y se cargaron las muestras en cada pozo.

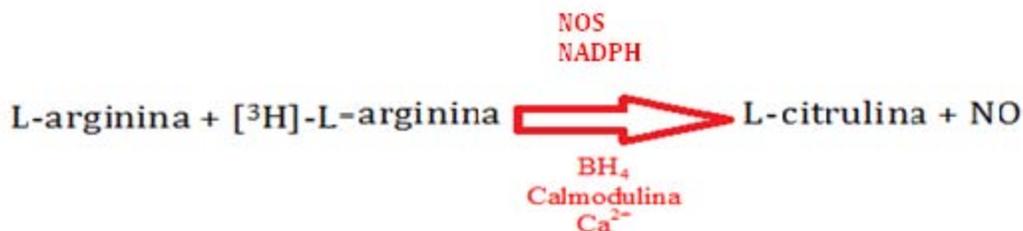
Para determinar la expresión, se realizó la separación de proteínas mediante una electroforesis SDS-PAGE al 10 % usando una cámara de electroforesis Miniprotean de Biorad por 30 minutos a 50 mV y posteriormente 1 h a 100 mV. Transcurrido el tiempo de electroforesis, se realizó una electrotransferencia por 2 h a 10 Volts usando una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad). La membrana se incubó con leche descremada al 10 % durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente con los siguientes anticuerpos primarios: Actina (1:1000); eNOS (1:300); iNOS (1:300); AT<sub>1</sub> (1:100); AT<sub>2</sub> (1:100) o MAS (1:300) toda la noche a 4 °C. Se hicieron lavados para posteriormente incubar con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. El revelado se llevó a cabo haciendo uso de reactivos para quimioluminiscencia marca Millipore.

## 6.6.-Determinación de Ang II, Ang-(1-7), BH<sub>2</sub>, BH<sub>4</sub> por electroforesis capilar

La concentración de Ang II, Ang-(1-7), BH<sub>2</sub> y BH<sub>4</sub> en orina y riñón se evaluó por medio de electroforesis capilar zonal (CZE) (p/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA)(74). Los tejidos de los grupos experimentales se homogenizaron (1:3 w/v) en ácido bórico 25 mM, pH 9.0. Las proteínas se removieron adicionando metanol frío (20 %) y la mezcla se centrifugó a 16,000 xg/10 °C, posteriormente se filtró a través de filtros de nitrocelulosa 0.22 µm. El capilar empleado se acondicionó haciendo pasar una solución de hidróxido de sodio (1 M) durante 30 minutos, posteriormente agua destilada por espacio de 30 minutos y finalmente el amortiguador de corrida durante 30 minutos. Las muestras se inyectaron bajo presión hidrodinámica a 0.5 psi/10s. La separación se realizó a 20 kV durante 10 minutos y la detección se realizó a 445 nm. El capilar fue lavado entre corridas con NaOH (1 M) durante dos minutos y agua destilada por 2 minutos. Los resultados se expresaron en pmol/mL. Las concentraciones de Ang II, Ang-(1-7), BH<sub>2</sub>, y BH<sub>4</sub> se determinaron mediante el empleo de una curva estándar. Los resultados se expresan como en pmol/L.

## 6.7.-Actividad de la sintasa del óxido nítrico

La actividad de la NOS, tanto la isoforma dependiente como la independiente de Ca<sup>2+</sup> se evaluaron teniendo como fundamento la conversión estequiométrica que la enzima lleva a cabo de [<sup>3</sup>H]-L-arginina a [<sup>3</sup>H]-L-citrulina más NO de acuerdo a la siguiente reacción:



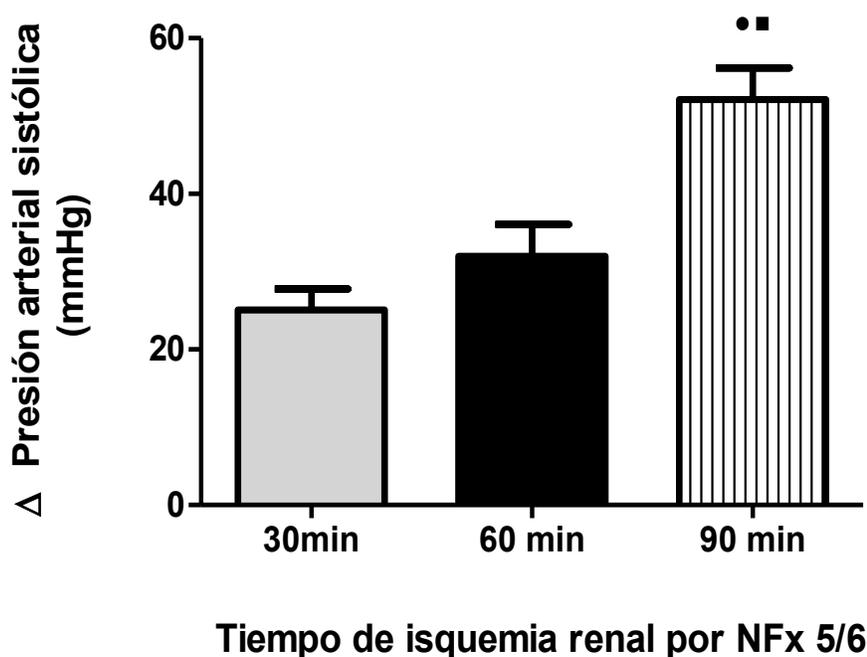
Para la medición de la actividad de la NOS cada tejido fue homogenizado con: 250  $\mu$ L de una mezcla de inhibidores de proteasas disueltos en una solución amortiguadora, la cual contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 % a pH de 7.5. La solución final de inhibidores fue preparada obteniendo las siguientes concentraciones finales: leupeptina 100 mM, PMSF 1 mM a partir de un stock de 100 mM disuelto en etanol, aprotina 2 mg/mL, 10 mg/mL de inhibidor de tripsina de soya (SBTI) y 0.1% (v/v) de tergitol tipo 40. Posteriormente el equivalente a 500  $\mu$ g de proteína de cada muestra fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C en presencia de los siguientes cofactores (todos a concentraciones finales en un volumen máximo de reacción de 100  $\mu$ L): NADPH 1 mM, calmodulina 100 nM, tetrahidrobiopterina 30  $\mu$ M y  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM. La mezcla de reacción también contenía 10  $\mu$ M L-arginina-HCl y 0.2  $\mu$ Ci de  $^3\text{H}$ -L-arginina (Amersham, aproximadamente 66 Ci/mmol). Para evaluar la actividad de la iNOS, las muestras se incubaron en presencia de EGTA y sin  $\text{CaCl}_2$ . Los volúmenes finales de reacción fueron ajustados a 100  $\mu$ L con una solución amortiguadora. Pasado el tiempo de incubación, la reacción fue detenida adicionando 1 mL de una solución amortiguadora de paro (EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, HEPES 20 mM, pH= 5.5). La mezcla de la reacción (volumen final 1.1 mL) fue transferida a una columna conteniendo 2.5 mL de resina de intercambio iónico (Dowex-500W), la cual fue capaz de retener a la L-arginina marcada y permitió que la L-citrulina fluyera a través de la columna; posteriormente, a cada eluyente de la mezcla de reacción se le adicionó 5 mL de líquido de centelleo Aquasol-2 (New England Nuclear) para su cuantificación en un contador de centelleo (Beckman LS6500). La actividad enzimática se expresó como ng  $^3\text{H}$ -L-citrulina/500  $\mu$ g de proteína en 30 minutos (67).

## **6.8.-Análisis de resultados**

El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando un Análisis de Varianza (ANOVA) de 1 vía, seguida por la prueba de Tukey para hacer comparaciones entre grupos. Las gráficas y el análisis estadístico se llevó a cabo usando el paquete Prism Graph Pad 5.0. Se consideró que existía diferencia significativa entre grupos cuando el valor de  $P < 0.05$ .

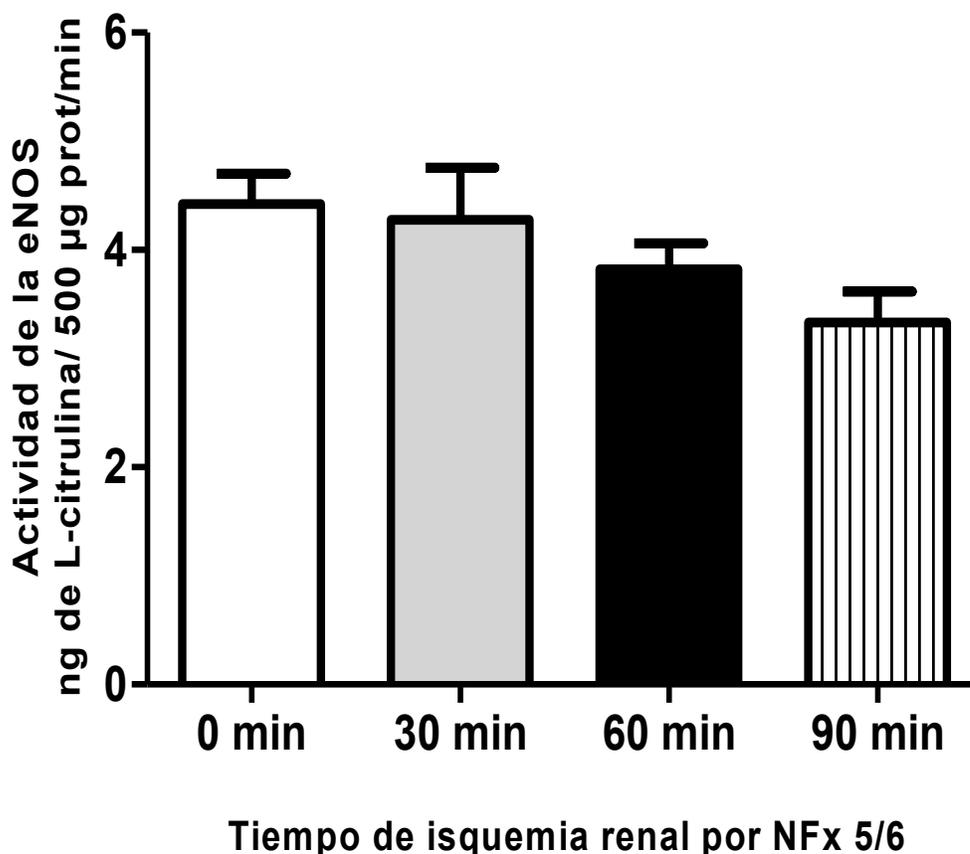
## 7.- RESULTADOS

La evaluación de la presión arterial en los diferentes grupos arrojó los siguientes resultados: Las ratas sham presentaron una presión arterial sistólica promedio de  $102.17 \pm 2.30$  mmHg, la presión arterial en los grupos nefrectomizados se incrementó con respecto a su basal; a los 30 min de isquemia el incremento fue de  $25.07 \pm 7.09$  mmHg, a los 60 min  $31.97 \pm 10.06$  mmHg, a los 90 min aumentó  $52.10 \pm 9.97$  en comparación a su propia condición basal (Figura 13). Nuestros resultados demuestran que durante la nefrectomía hay un incremento de la presión arterial sistólica en función del tiempo.



**Figura 13.- Evaluación del cambio en la presión arterial sistólica en función del tiempo con isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La presión sistólica se evaluó en ratas control (sham) y sometidas a 30, 60 y 90 min de isquemia renal producida por nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. El cero en la gráfica nos indica la diferencia de la presión en ratas sham. Las diferencias estadísticas se indican mediante el uso de los símbolos siguientes:  
●  $P < 0.05$  vs. 30 min, ■  $P < 0.05$  vs. 60 min.

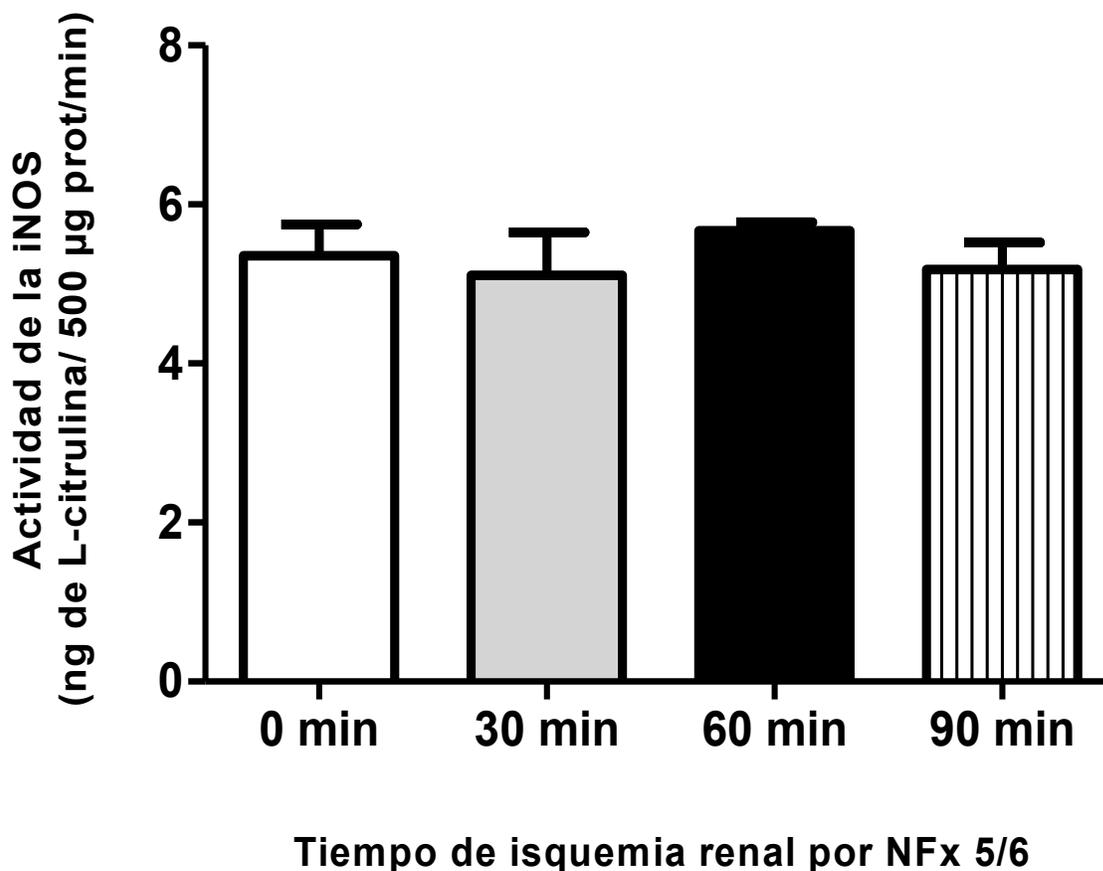
Posteriormente, se determinó la actividad catalítica de la NOS renal. Los resultados muestran una tendencia a disminuir la actividad conforme aumenta el tiempo de isquemia. Sin embargo no se presenta diferencia significativa (0 min:  $4.420 \pm 0.626$ ; 30 min:  $4.278 \pm 0.952$ ; 60 min:  $3.823 \pm 0.529$ ; 90 min:  $3.334 \pm 0.631$  ng L-citrulina/500  $\mu$ g proteína/min), respectivamente (Figura 14).



**Figura 14.- Actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva o dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (eNOS) a diferentes tiempos de la nefrectomía 5/6 (NFx 5/6).** La actividad de la eNOS se evaluó en el riñón viable de las ratas control (sham) y sometidas a NFx 5/6 por 30, 60 y 90 min. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

También evaluamos la actividad de la iNOS y nuestros resultados muestran que la actividad de esta enzima fue equiparable entre los diferentes grupos experimentales (Figura 15).

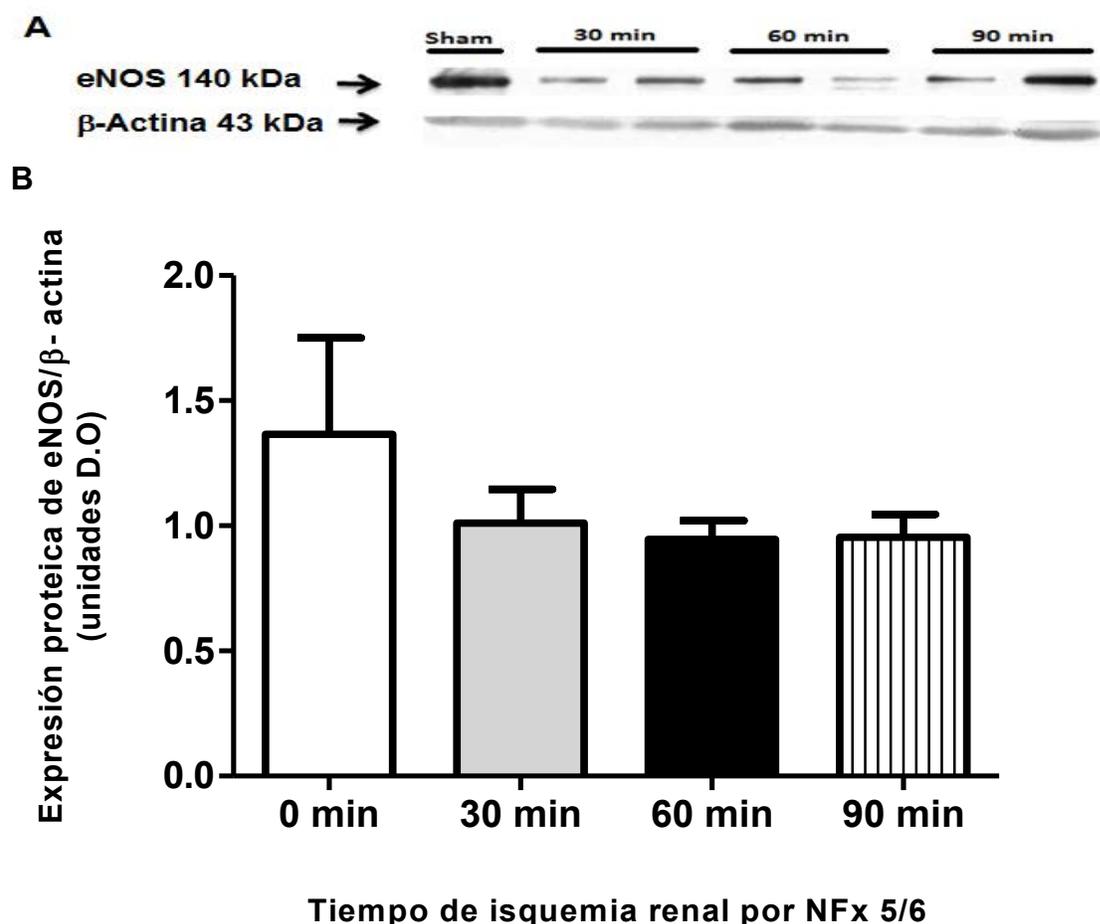
Sin embargo la actividad de NOS inducible no muestra cambio alguno en ningún tiempo de isquemia (0 min  $5.35 \pm 0.884$ ; 30 min:  $5.10 \pm 1.07$ ; 60 min:  $5.66 \pm 0.222$ ; 90 min:  $5.18 \pm 0.762$  ng L-citrulina/500  $\mu$ g proteína/min) (Figura 15).



**Figura 15.- Actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) a diferentes tiempos de la NFx 5/6.** La actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible se evaluó en el riñón viable de las ratas control (0 min) y sometidas NFx 5/6 por 30, 60 y 90 min. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

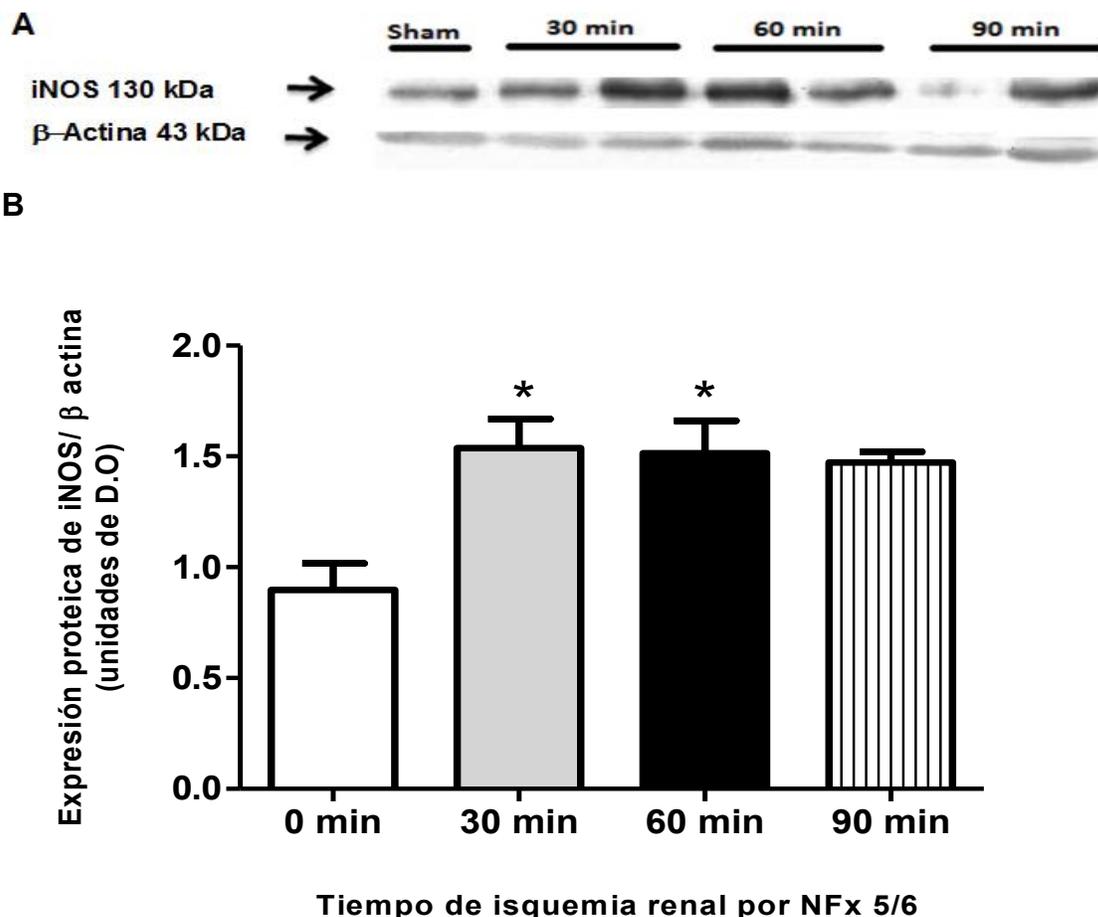
La evaluación de la expresión de la eNOS no mostró cambios significativos por efecto del tiempo de NFx 5/6 (Figura 16). A semejanza de lo que observamos en la evaluación de su actividad enzimática, aquí también se distingue una tendencia a la disminución por efecto de la NFx 5/6.

También se observan cambios en la expresión proteica, en los cuales la cantidad de proteína correspondiente a eNOS se encuentra disminuida ambos datos podrían sugerir una disminución en la producción de NO biodisponible durante la NFx 5/6 (Figura 16).



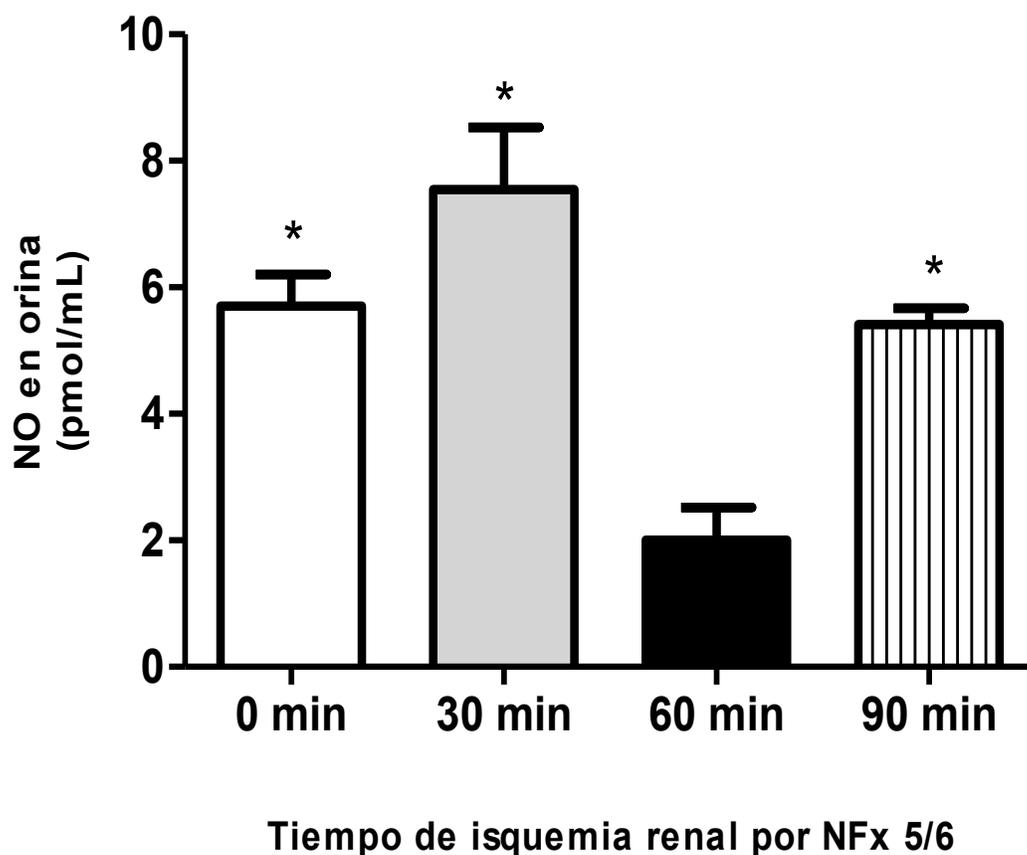
**Figura 16.- Evaluación de la expresión proteica de la sintasa del óxido nítrico endotelial del riñón de ratas con nefrectomía 5/6.** La expresión de la eNOS fue evaluada por western blot. (A) Fotografía de un Western blot representativo. Las bandas muestran la expresión de eNOS y  $\beta$ -actina de ratas controles (0 min) y ratas sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). (B) Cuantificación densitométrica, observando una tendencia a disminuir la producción de eNOS biodisponible durante la NFx 5/6. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. Para las muestras de nefrectomía son por duplicado mientras la control es una sola muestra.

También evaluamos la expresión proteica de la iNOS y en nuestros resultados muestran que la expresión correspondiente a iNOS se observa un aumento en la expresión a los 30 y 60 minutos (Figura 17).



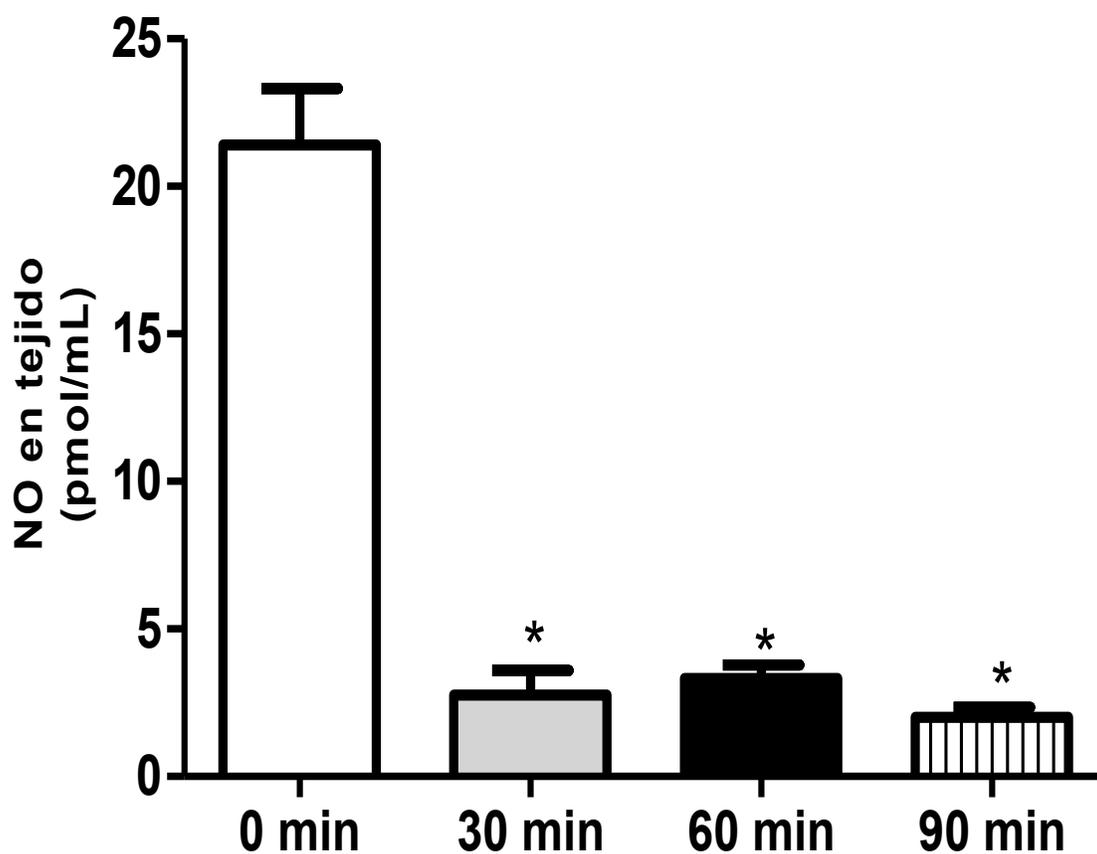
**Figura 17.- Evaluación de la expresión proteica de la sintasa del óxido nítrico inducible del riñón de ratas con nefrectomía 5/6.** La expresión de la iNOS fue evaluada por western blot. (A) Fotografía de un western blot representativo de iNOS renal. Las bandas muestran la expresión de iNOS y  $\beta$ -actina de ratas controles (sham y ratas sometidas a 30, 60, 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). (B) Cuantificación densitométrica, observando un aumento en la producción de iNOS durante la NFX 5/6, las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \*P<0.05 vs 0 min.

Interesantemente observamos que el NO urinario se encuentra significativamente disminuido sólo a los 60 min post NFX 5/6 respecto a las demás condiciones experimentales (0 min  $5.707 \pm 1.868$ ; 30 min  $7.547 \pm 2.187$ ; 60 min  $2.000 \pm 1.043$  y a los 90 min  $5.414 \pm 0.519$  pmol/mL) mostrando diferencia estadísticamente significativa (Figura 18).



**Figura 18.- Evaluación del óxido nítrico en orina en función de la isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de NO en orina se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  vs 60 min.

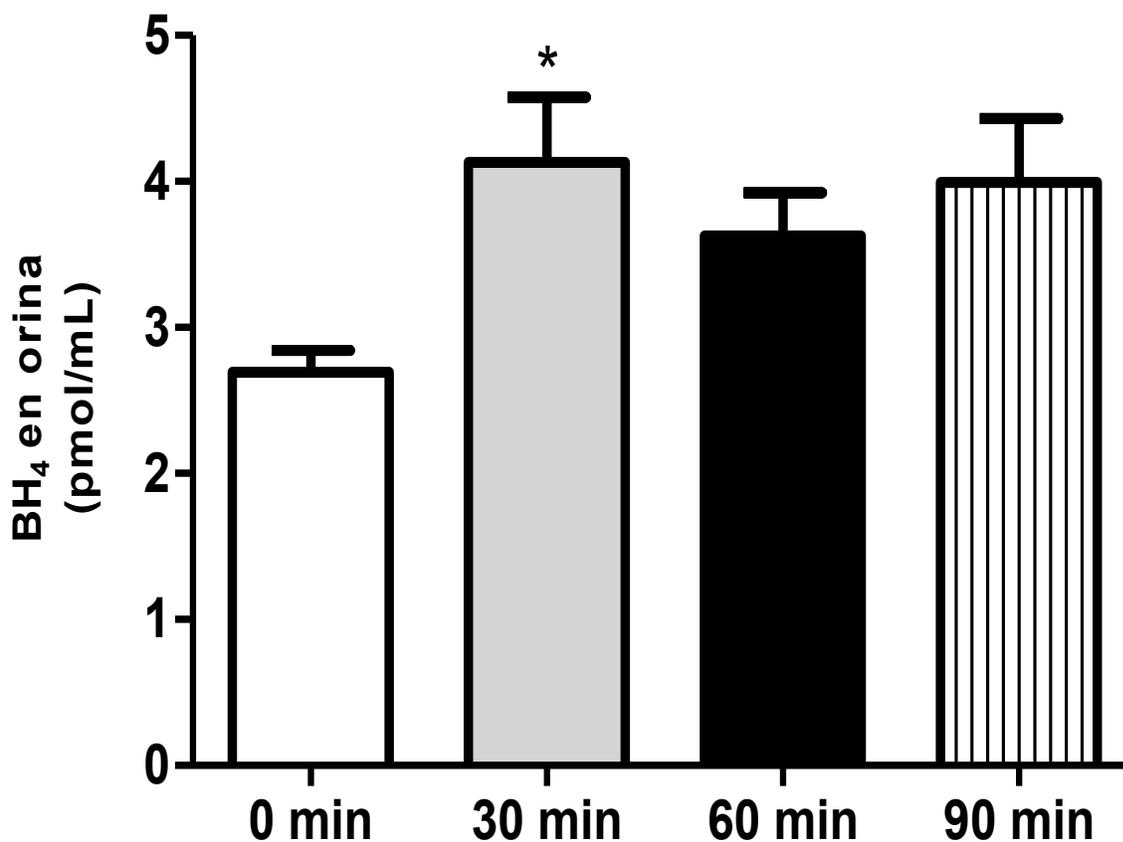
Nuestros resultados muestran que el NO en tejido esta significativamente disminuido conforme aumenta el tiempo de ischemia (0 min  $21.397 \pm 5.15$ ; 30 min  $4.017 \pm 1.862$ ; 60 min  $3.313 \pm 1.053$  y a los 90 min  $2.007 \pm 0.828$  pmol/mL) (Figura 19).



**Tiempo de ischemia renal por NFx 5/6**

**Figura 19.- Evaluación del óxido nítrico en tejido renal en función del tiempo de ischemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de NO en tejido se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  vs 0 min.

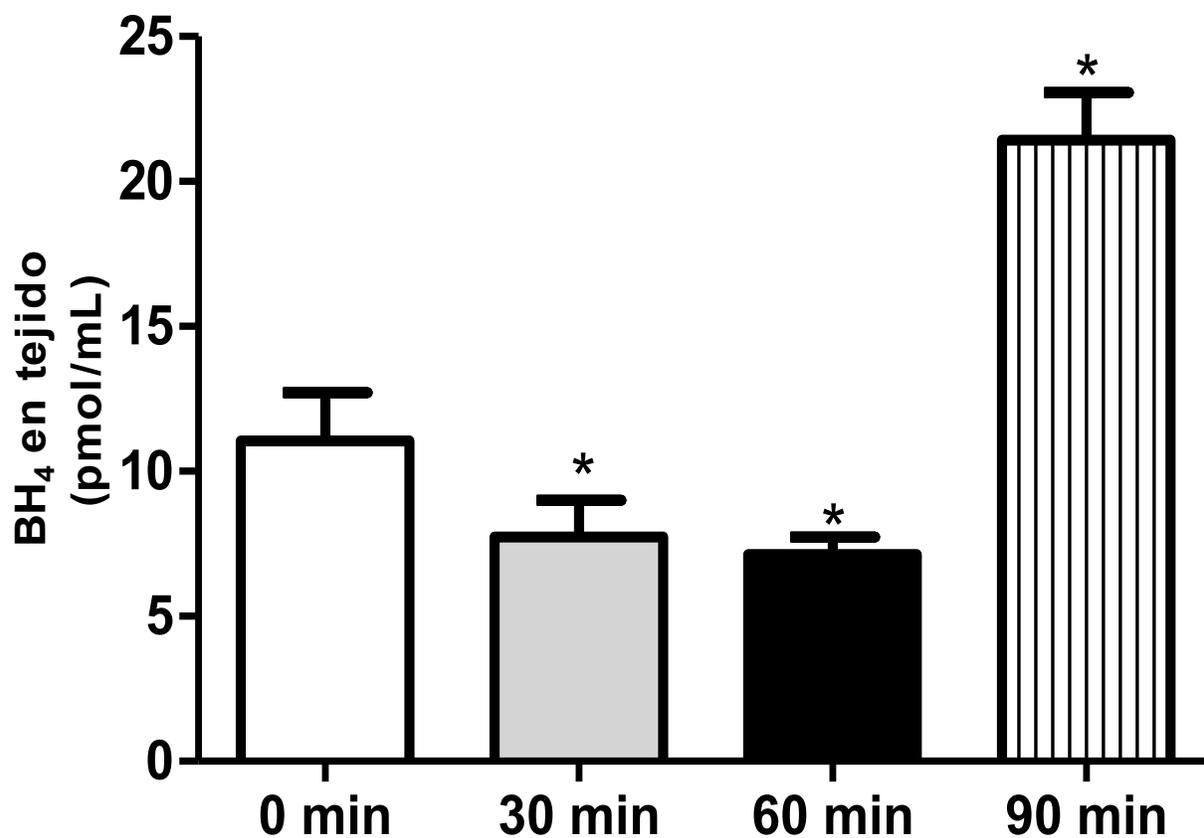
Al evaluar las concentraciones de BH<sub>4</sub> en orina observamos un incremento significativo a los 30 minutos de isquemia y a tiempos mayores persistió la tendencia pero sin mostrar cambios significativos respecto al control (Figura 20). Estos resultados nos indican que la NFx 5/6 afecta en la producción de BH<sub>4</sub> en la orina.



### Tiempo de isquemia renal por NFx 5/6

**Figura 20.- Aumento de la concentración en orina de BH<sub>4</sub> a los 30 minutos con isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de BH<sub>4</sub> en orina se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6. Las barras muestran el promedio ± el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \* P<0.05 vs 0min.

La evaluación de la concentración de BH<sub>4</sub> en los riñones viables mostró que a los tiempos de 30 y 60 minutos post-isquemia se observan menores concentraciones de BH<sub>4</sub> aunque no alcanzan diferencias significativas respecto al control. Por el contrario, a un tiempo de ischemia mayor (90 min), observamos un incremento significativo de BH<sub>4</sub> respecto al control (Figura 21).

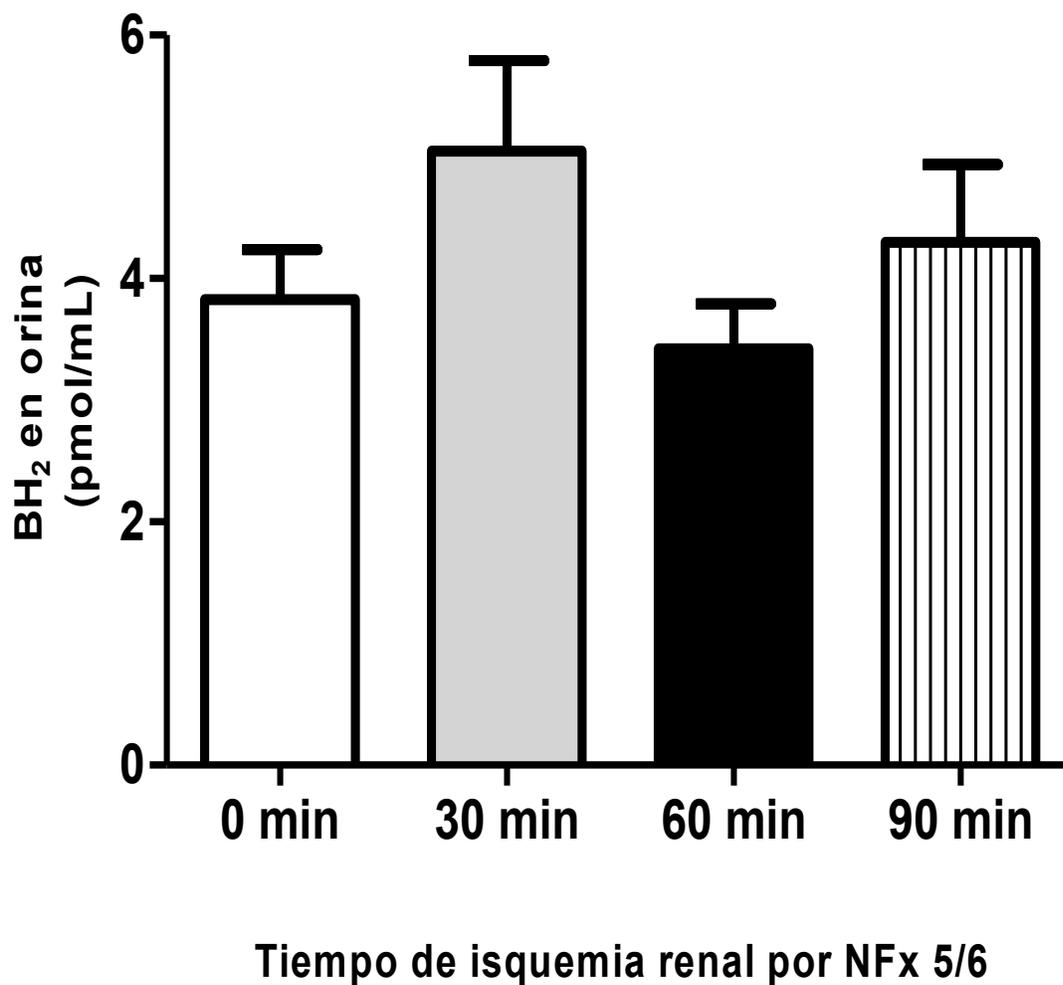


**Tiempo de ischemia renal por NFX 5/6**

**Figura 21.- Disminución de la concentración en tejido de BH<sub>4</sub> a los 30 y 60 minutos, con aumento a los 90 minutos de ischemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6. La concentración de BH<sub>4</sub> en tejido se midió por CZE. Los valores representan la media ± el error estándar de la media de 6 experimentos.**

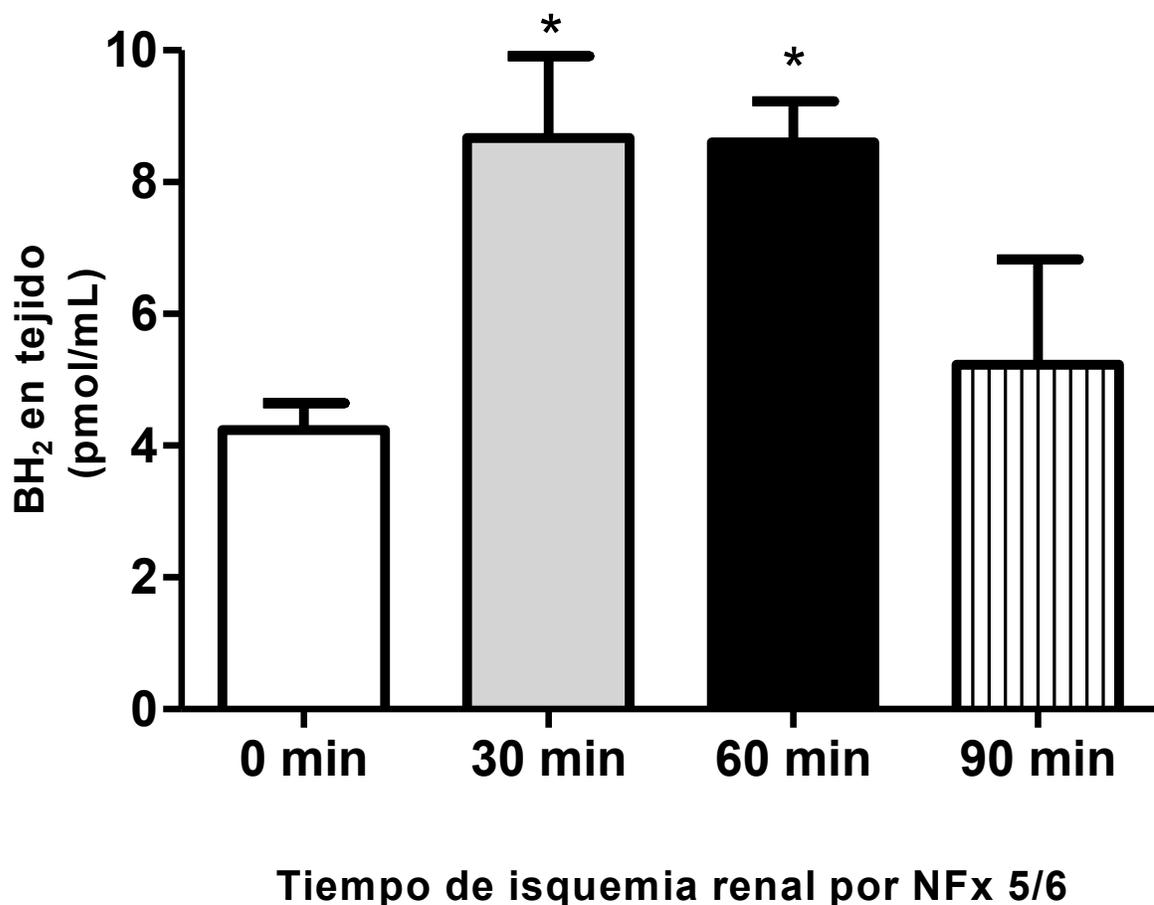
\* P<0.05 vs 0 min.

Nuestros resultados muestran que el BH<sub>2</sub> en orina no fue estadísticamente diferente entre los grupos experimentales (Figura 22).



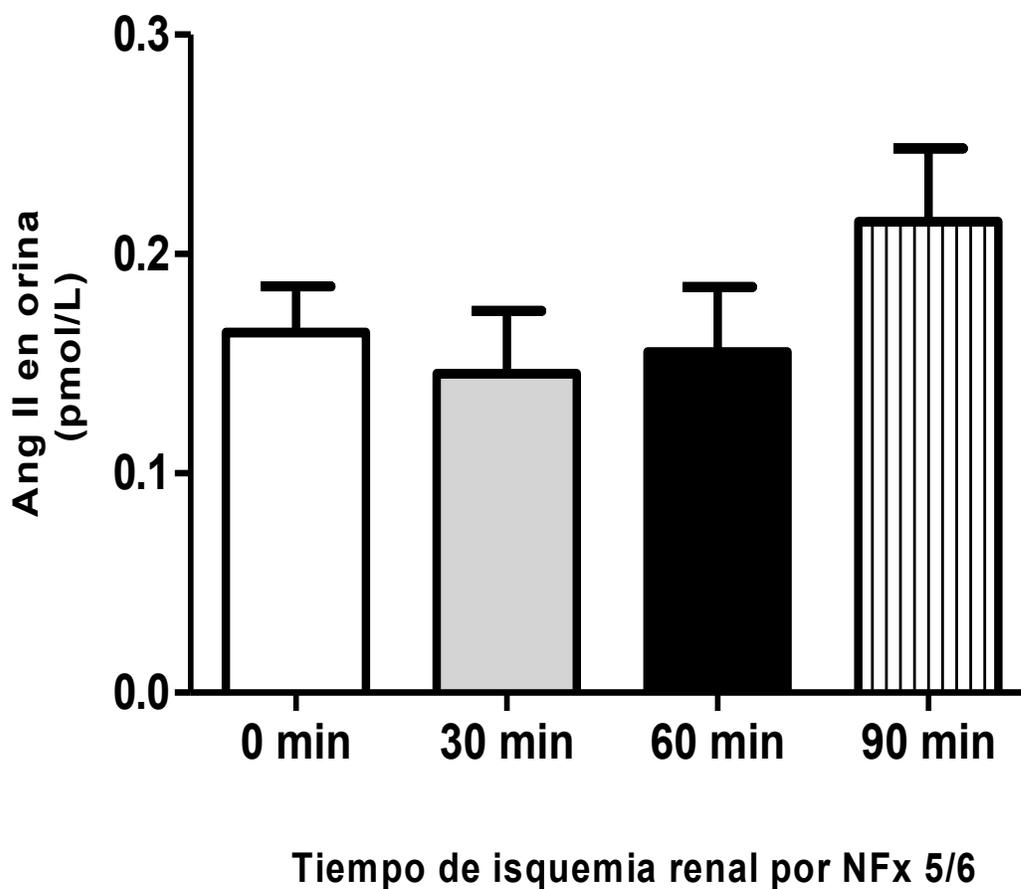
**Figura 22.- Evaluación del BH<sub>2</sub> en orina en función del tiempo de isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de BH<sub>2</sub> en orina se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). Las barras muestran el promedio ± el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

Con respecto al BH<sub>2</sub> en tejido observamos un aumento significativo respecto al control a los 30 y 60 minutos de isquemia (Figura 23). Estos resultados nos indican que la NFx 5/6 afecta en la producción de BH<sub>2</sub>.



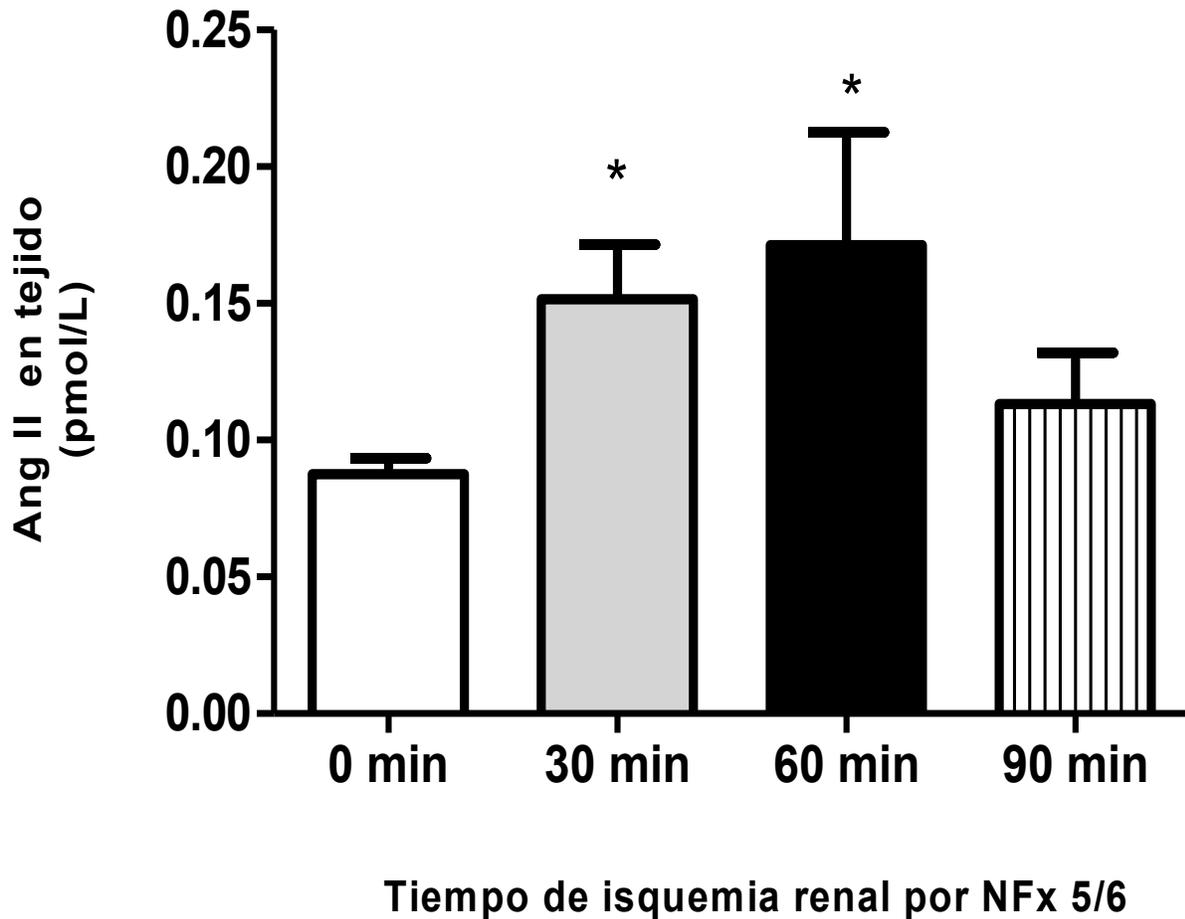
**Figura 23.- Aumento de la concentración en tejido de BH<sub>2</sub> a los 30 y 60 minutos con isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de BH<sub>2</sub> en tejido se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). Las barras muestran el promedio ± el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \* P<0.05 vs 0 min.

En relación a la concentración de Ang II en orina, su análisis por CZE nos mostró que, las ratas de los diferentes grupos experimentales excretan en orina concentraciones equivalentes de este péptido (Figura 24). A diferencia de esto, la concentración de Ang II en tejido se incrementó significativamente en las ratas sometidas a 30 y 60 min de isquemia (Figura 25).



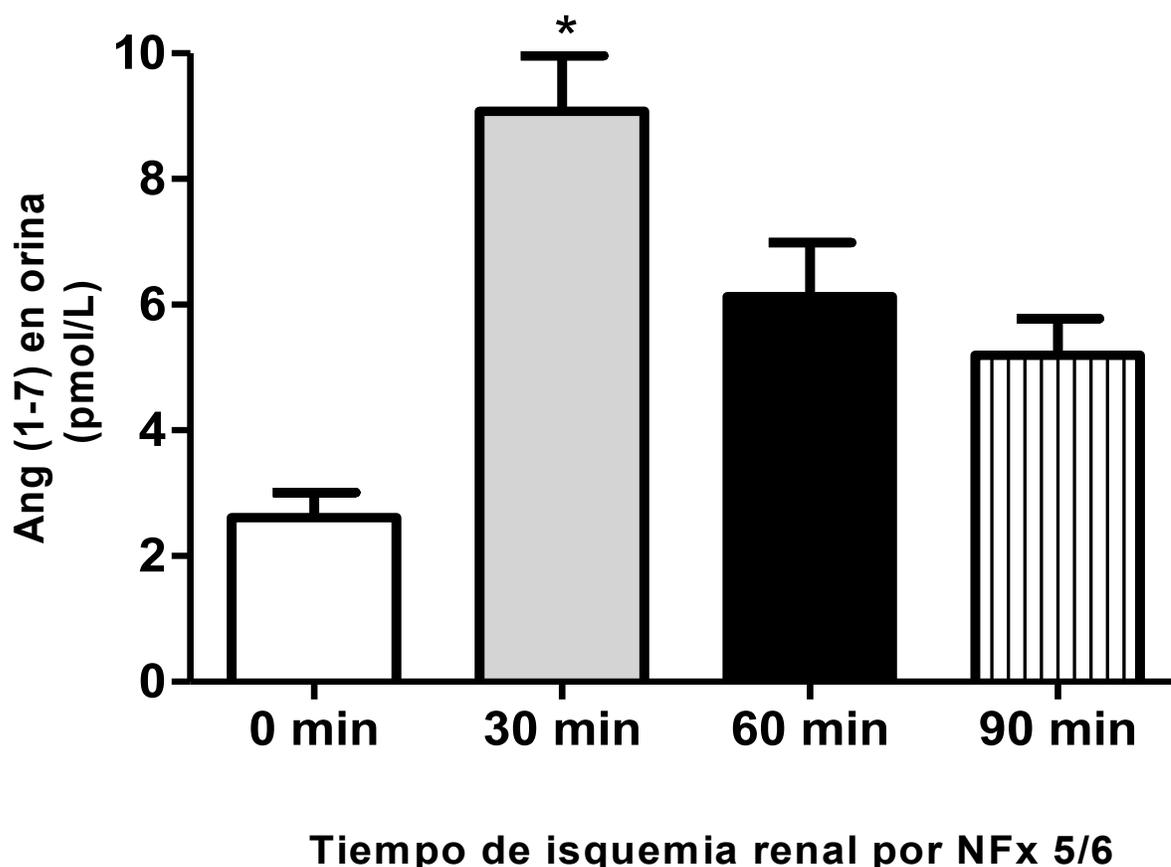
**Figura 24.- Evaluación de la Ang II en orina en función de la isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de Ang II en orina se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

El incremento observado parecería una respuesta aguda ya que los valores obtenidos a los 90 minutos post-isquemia tienden a regresar a los valores basales del control (Figura 25).



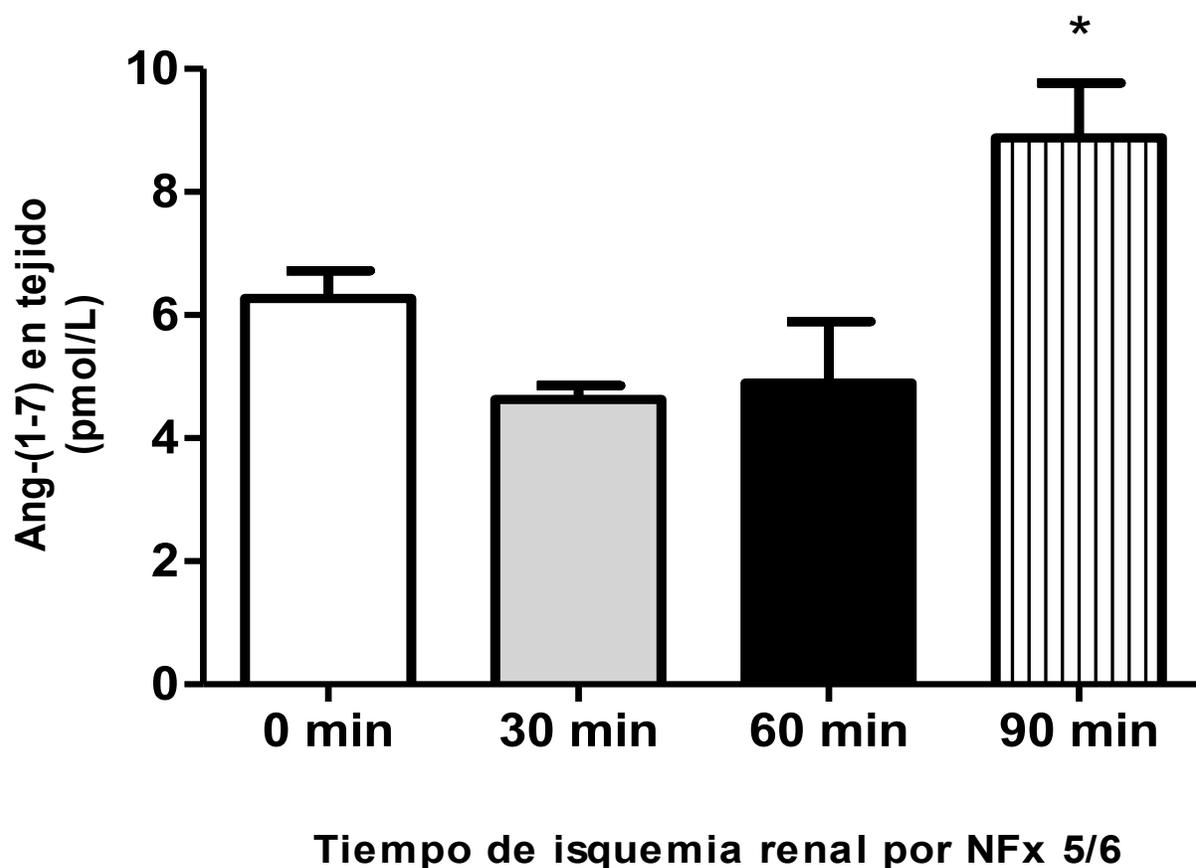
**Figura 25.- Evaluación de la Ang II en tejido en función de la ischemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de Ang II en tejido se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.\*  $P < 0.05$  vs 0 min.

Otro metabolito integrante del SRAA que evaluamos fue la Ang-(1-7). La orina de las ratas control (0 min) excretaron  $2.588 \pm 1.702$  pmol/L de Ang-(1-7), la concentración de este péptido en la orina de las ratas con 30 min de NFX 5/6 se incrementó significativamente ( $9.077 \pm 2.174$  pmol/L) siendo este valor el más elevado de todos los tiempos estudiados (Figura 26).



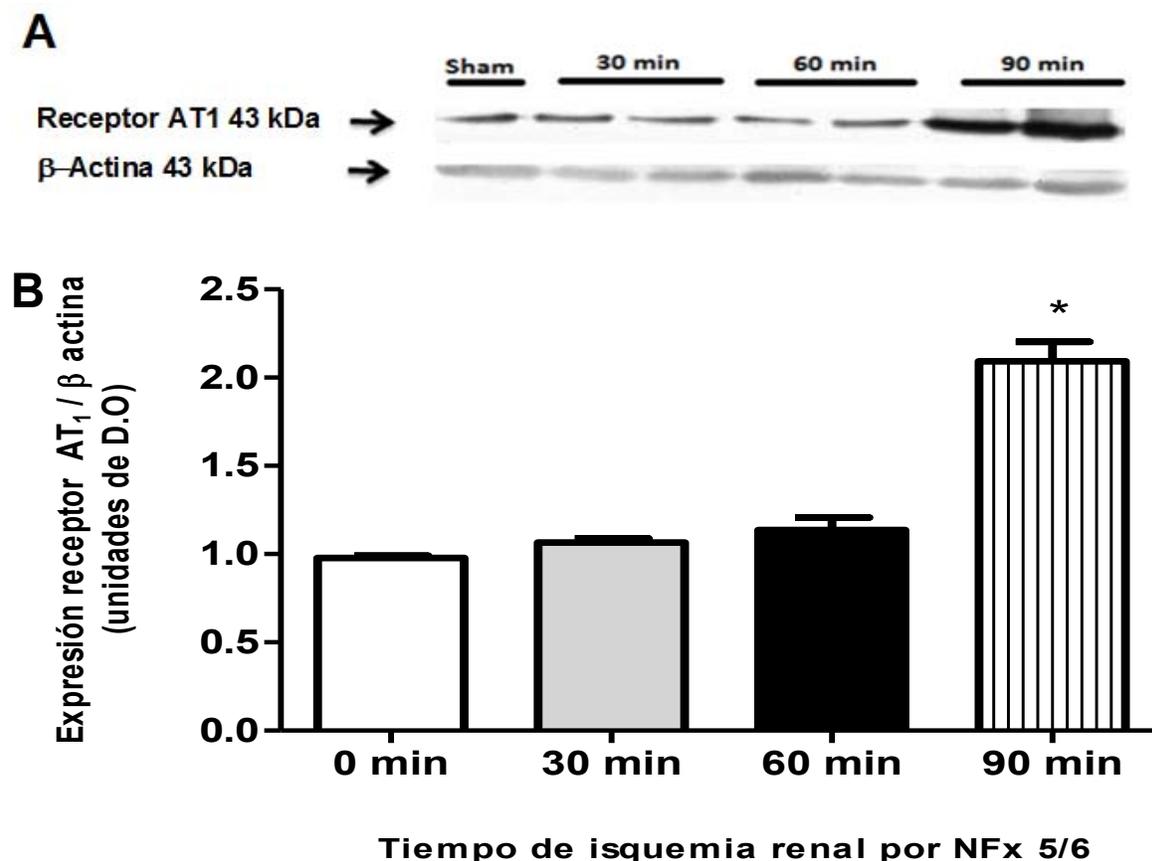
**Figura 26.- Evaluación de angiotensina-(1-7) en orina en función de la isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de Ang-(1-7) en orina se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.  
\*  $P < 0.05$  vs 0 min.

En el tejido observamos un comportamiento inverso al encontrado en la orina. En este caso la concentración tisular de Ang-(1-7) tendió a disminuir a los 30 y 60 min ( $4.631 \pm 0.829$  y  $4.892 \pm 0.932$  pmol/L, respectivamente); sin embargo, a los 90 min se produjo un incremento significativo en la concentración de Ang-(1-7) ( $8.878 \pm 1.875$  pmol/L) contra todos los demás grupos estudiados (Figura 27).



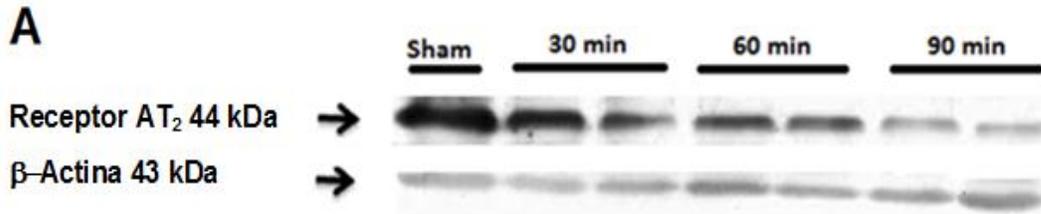
**Figura 27.- Evaluación de angiotensina-(1-7) en tejido en función de la isquemia renal producida en ratas con nefrectomía 5/6.** La concentración de Ang-(1-7) tisular se evaluó por CZE en ratas control (0 min) y sometidas a 30, 60 y 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). Las barras muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  vs 0 min, 30 min, 60 min.

A fin de conocer el perfil de expresión de receptores con los que pueden interactuar Ang II y Ang-(1-7) llevamos a cabo la evaluación de su expresión proteica. En relación al receptor AT<sub>1</sub> observamos que su expresión se mantiene comparable al control a los 30 y 60 min de la NFX 5/6, sin embargo a los 90 minutos de ischemia puede observarse un incremento significativo en su expresión (Figura 28).

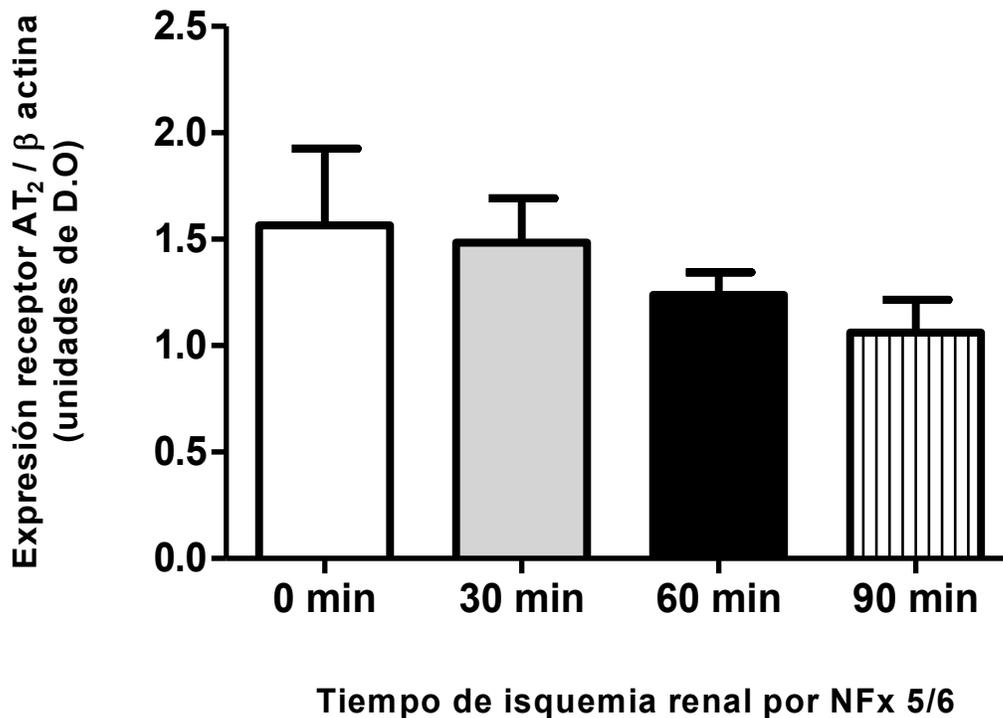


**Figura 28.- Evaluación de la expresión del receptor AT<sub>1</sub> del riñón de ratas con nefrectomía 5/6.** La expresión del receptor AT<sub>1</sub> fue evaluada por western blot. (A) Fotografía de un western blot representativo para AT<sub>1</sub> de tejido renal. Las bandas muestran la expresión de AT<sub>1</sub> y β-actina de ratas control (0 min y ratas sometidas a 30, 60, 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). (B) Cuantificación densitométrica. Las barras representan la media ± el error estándar de la media de 6 experimentos independientes. \* P<0.05 vs 0 min, 30 min, 60 min.

Con respecto a la expresión del receptor  $AT_2$  se muestra que aunque se presenta una tendencia a disminuir su expresión en función del tiempo, ésta no es estadísticamente diferente (Figura 29).

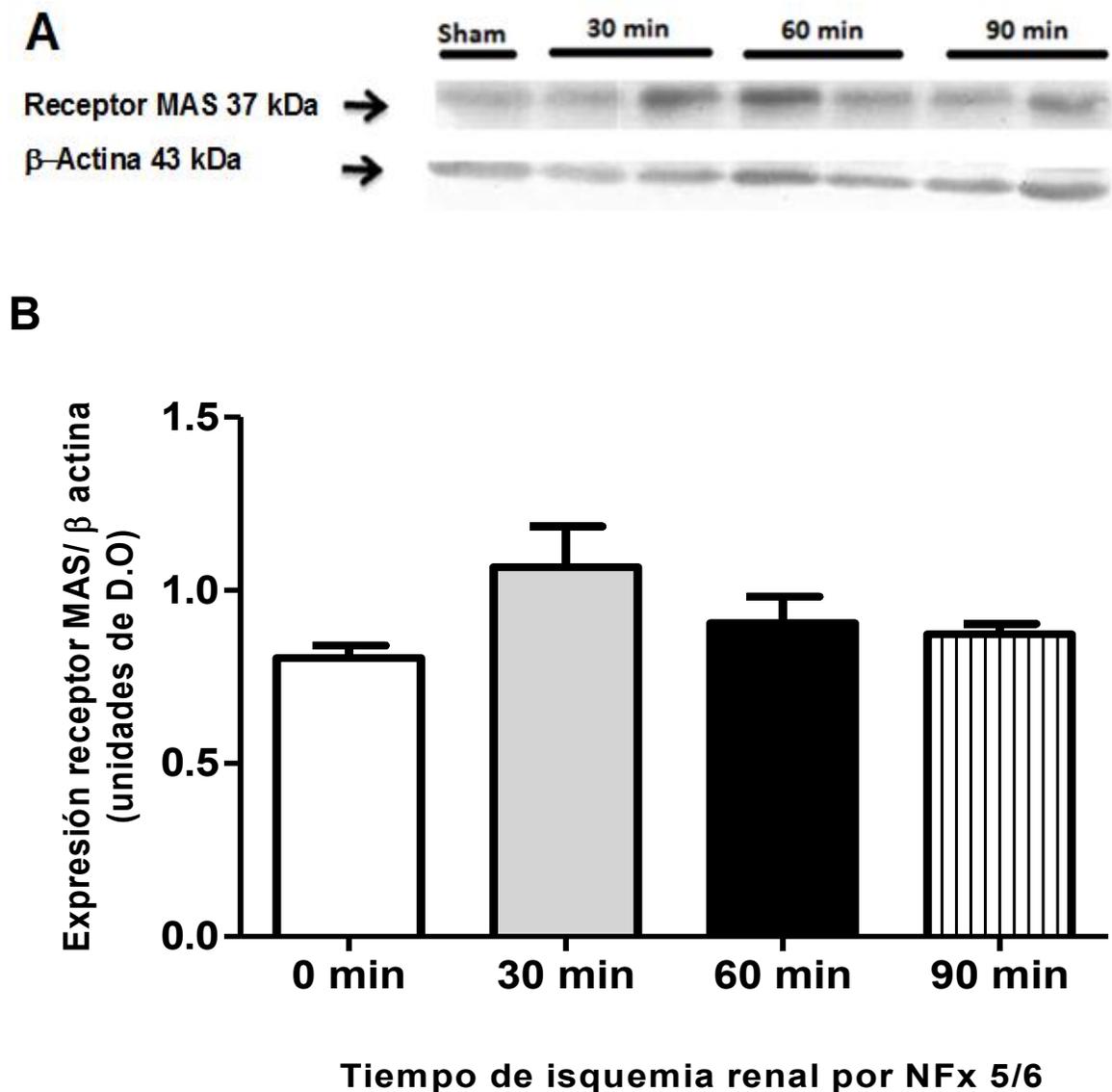


**B**



**Figura 29.- Evaluación de la expresión del receptor  $AT_2$  del riñón de ratas con nefrectomía 5/6.** La expresión del receptor  $AT_2$  fue evaluada por western blot. (A) Las bandas muestran la expresión de  $AT_2$  y  $\beta$ -actina de ratas control (0 min y ratas sometidas a 30, 60, 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFX 5/6). (B) Cuantificación densitométrica. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

Finalmente observamos que la expresión del receptor MAS se mantiene constante durante todos los tiempos de isquemia (Figura 30).



**Figura 30.- Evaluación de la expresión del receptor MAS del riñón de ratas con nefrectomía 5/6.** La expresión del receptor MAS fue evaluada por western blot. (A). Las bandas muestran la expresión de MAS y β-actina de ratas control (0 min y ratas sometidas a 30, 60, 90 minutos de nefrectomía 5/6 (NFx 5/6). (B) Cuantificación densitométrica. Las barras representan la media ± el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

## 8.-DISCUSIÓN

La nefrectomía 5/6 es un modelo de insuficiencia renal crónica utilizado para el estudio de los cambios hemodinámicos propios de la enfermedad renal a mediano y largo plazo. Este modelo presenta las siguientes características: proteinuria, supresión del flujo urinario, lesión de los túbulos renales, hipertensión, disminución del FG por lo que se asemeja a la condición humana y por lo tanto es un buen modelo. Este modelo lo utilizamos para demostrar los cambios fisiológicos a minutos y horas de iniciado el daño renal agudo. El riñón es el principal órgano que controla la presión arterial, cualquier daño sobre éste repercute en un incremento en los valores de presión arterial. Los estudios clínicos han mostrado que independientemente de la patología que desencadene los cambios en la función renal, éstos tienen como consecuencia el desarrollo de hipertensión arterial. En nuestro estudio, observamos que un periodo agudo de daño es capaz de incrementar los valores de la presión arterial, siendo, por lo tanto, la hipertensión arterial secundaria al daño renal. Creemos que el incremento en la presión arterial secundario al daño renal inducido por la NFX 5/6 tiene varios factores. El factor mecánico por el repentino incremento del flujo sanguíneo hacia 1/6 del riñón, y otro factor vascular, en donde participa el balance de las especies vasoconstrictoras como la Ang II y las vasodilatadoras como son el NO y la Ang-(1-7). En nuestro estudio se observó que la producción del NO en el tejido renal funcional disminuía en función del tiempo en que se presenta la insuficiencia renal, siendo evidente desde los 30 minutos. Para que se produzca el NO, se necesita que la NOS tenga sus cofactores disponibles. En el trabajo de Cervantes-Pérez et al, 2012 se observa que durante la hipertensión arterial secundaria a coartación de la aorta, el acople de la eNOS se encuentra disminuido. Uno de los cofactores más importantes es la BH<sub>4</sub>, ya que a través de ella se forma el homodímero estable que permite el transporte de electrones (75), Trabajos como el de I. González en el 2007 (76), S. Llorens y E. Nava en el 2003 (77) demuestran que en diferentes patologías vasculares como son la hipertensión arterial, aterosclerosis y la diabetes, cualquier maniobra que logre incrementar la producción de la BH<sub>4</sub> será traducido como una mejora en la condición endotelial. Nuestras

observaciones sugieren que en el daño renal podría estar disminuyendo la expresión del dímero de eNOS como consecuencia de la disminución en la concentración de BH<sub>4</sub> en tejido (30 Y 60 minutos) y el incremento en la concentración de BH<sub>2</sub> en tejido. Sin embargo, la concentración de BH<sub>4</sub> en tejido parece estar aumentada en el tiempo más largo de exposición a la nefrectomía (90 minutos); lo cual nos hace pensar que durante el daño renal por nefrectomía, podría existir un mecanismo que compense la producción de BH<sub>4</sub> y ese mecanismo puede ser la ruta de salvamento en la cual la BH<sub>2</sub> se convierte a BH<sub>4</sub>, ya que la BH<sub>2</sub> se encuentra disminuida a esos mismos tiempos.

Posiblemente el daño glomerular se este presentando desde los 30 primeros minutos ya que la concentración de BH<sub>4</sub> en orina aumentó y a tiempo mayores persiste la tendencia, mientras que la BH<sub>2</sub> en orina no hay diferencia lo cual corresponde a la disminución en tejido y haya una compensación.

La Ang-(1-7) provoca vasodilatación que es mediada por el endotelio e involucra mecanismos moleculares para la activación eNOS. Previos estudios demuestran que las células endoteliales son capaces de generar Ang-(1-7) a partir de sus precursores Ang I y Ang II, porque expresan las carboxipeptidasas necesarias para producirla (78).

A los 90 minutos de la NFx 5/6 se observa una aumento en la Ang-(1-7) y de la BH<sub>4</sub> y estos efectos pueden estar beneficiando el acople de la eNOS y por lo tanto su correcta actividad.

Una vez que determinamos como se encontraba la expresión de la eNOS, decidimos correlacionarla con su actividad enzimática. Observamos tendencia a disminuir la actividad enzimática de la NOS dependiente de calcio que correspondía a la disminución observada en su expresión. Estos resultados indican que la principal fuente de NO es la eNOS y que estos efectos pueden estar dados por la degradación de eNOS, mientras que los datos de la NOS independiente de calcio no hay diferencia entre cada grupo en su actividad y expresión, quizás porque el tiempo de daño no es suficiente para producir una respuesta inflamatoria. Nuestra hipótesis apunta a que en el daño renal agudo, existe un cambio en el balance entre el NO y la Ang II, el NO biodisponible disminuye, mientras que la Ang II permanece constante o bien incrementa.

Otra razón podría ser que al disminuir al receptor  $AT_2$  provoca una tendencia a disminuir la actividad de la eNOS disminuyendo la concentración del NO, por lo cual produce vasoconstricción observando un aumento del receptor  $AT_1$

La concentración de Ang II en tejido aumentó a partir de los 30 minutos mientras que a los 90 minutos empieza a disminuir los niveles de Ang II y aumentan Ang-(1-7) lo cual sugiere que hay una compensación. La presencia del receptor  $AT_1$  y  $AT_2$  en el riñón nos permitió evaluar la participación de los receptores mediante la cuantificación proteica.

El receptor  $AT_2$  y la producción de NO tienen efectos vasodilatadores que son opuestos a los del receptor  $AT_1$ , la tendencia de la disminución de la expresión de  $AT_2$  a partir de los 30 minutos manteniéndose hasta los 90 minutos, nos permite sugerir que está favorecido el efecto de la Ang II por  $AT_1$ , ya que Ang II es un potente vasoconstrictor cuyos efectos se observan a corto y a largo plazo provocando cambios estructurales, afectando los parámetros hemodinámicos y favoreciendo el efecto vasoconstrictor. En nuestro estudio, por ser de tipo agudo, no observamos los cambios estructurales, sin embargo, el incremento en la presión arterial sí nos habla de los efectos vasocontráctiles de Ang II por la interacción con  $AT_1$ , sosteniendo la presión arterial en valores altos.

La interacción del receptor Mas con Ang-(1-7) provoca vasorelajación afectando la resistencia vascular periférica, lo cual contribuye a contrarrestar los efectos vasopresores de AngII y de esta manera mantiene la presión arterial en valores normales; sin embargo, en nuestros resultados se puede observar que a pesar de que la concentración del receptor Mas se mantiene constante y hubo un incremento en Ang-(1-7), no observamos reducción en la presión arterial.

Nuestro estudio mostró que a los 30 minutos de generar el daño renal agudo, el factor vascular ya se encuentra dañado ya que los componentes de este sistema como son la producción de óxido nítrico y la producción de Ang II están en desbalance. Sin embargo, parece haber una forma de compensación al daño renal dependiente de Ang-(1-7) y de  $BH_4$  en el tiempo máximo de isquemia.

## 9.- CONCLUSIONES

\*La presión arterial sistólica se incrementó en función del tiempo en ratas con nefrectomía 5/6.

\*El NO en tejido disminuyó desde los 30 minutos de nefrectomía 5/6.

\*Las concentraciones de BH<sub>4</sub> en tejido se encuentran aumentados a los 90 minutos de nefrectomía 5/6.

\*La expresión proteica de la eNOS no mostró cambios significativos por efecto del tiempo de nefrectomía 5/6.

\*La concentración de Ang II en tejido aumento a los 30 y 60 minutos del tiempo de nefrectomía.

\*EL receptor AT<sub>2</sub> mostró una tendencia a disminuir a partir de los 30 minutos de nefrectomía.

## 10.-REFERENCIAS

1. F. Sl., *Fisiología Humana*. (McGraw-Hill-Interamericana Madrid ed. 10 a, 2008), pp. 560-568.
2. M. D. Jorge E. Velásquez, Luis E. Medina, Jorge E. Marín, Julián M. Aristizábal, Juan C. Díaz, William Uribe Denervación simpática de las arterias renales. *Elsevier Doyma* **21**, 102 (2014).
3. Ganong. (McGraw-Hill Interamericana de España S.L España S.L., 2010), pp. 603-610
4. A. J. Vander, in *Renal Physiology* (McGraw-Hil, 1995), pp. 194-198.
5. R. De Caterina, Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Current opinion in lipidology* **11**, 9 (Feb, 2000).
6. G. y. Hall, *Tratado de fisiología médica* (ed. 12a, 2011).
7. J. M. Harris, R. A. Gomez, Renin-angiotensin system genes in kidney development. *Microscopy research and technique* **39**, 211 (Nov 1, 1997).
8. R. Kumar, M. A. Boim, Diversity of pathways for intracellular angiotensin II synthesis. *Current opinion in nephrology and hypertension* **18**, 33 (Jan, 2009).
9. M. Mukoyama *et al.*, Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *The Journal of biological chemistry* **268**, 24539 (Nov 25, 1993).
10. M. de Gasparo, K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, T. Unger, International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* **52**, 415 (Sep, 2000).
11. R. M. Carey, H. M. Siragy, Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews* **24**, 261 (Jun, 2003).
12. J. L. Hansen *et al.*, Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circulation research* **87**, 753 (Oct 27, 2000).
13. M. Horiuchi, M. Akishita, V. J. Dzau, Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* **33**, 613 (Feb, 1999).
14. A. Nishiyama, D. M. Seth, L. G. Navar, Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension* **39**, 129 (Jan, 2002).
15. M. Donoghue *et al.*, A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research* **87**, E1 (Sep 1, 2000).
16. D. W. Lambert, N. M. Hooper, A. J. Turner, Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochemical pharmacology* **75**, 781 (Feb 15, 2008).
17. S. R. Tipnis *et al.*, A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* **275**, 33238 (Oct 27, 2000).
18. M. J. Soler, J. Lloveras, D. Batlle, [Angiotensin converting enzyme 2 and its emerging role in the regulation of the renin angiotensin system]. *Medicina clinica* **131**, 230 (Jul 12, 2008).
19. R. A. Santos, M. J. Campagnole-Santos, S. P. Andrade, Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory peptides* **91**, 45 (Jul 28, 2000).
20. F. Gembardt *et al.*, Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* **26**, 1270 (Jul, 2005).
21. M. F. Doobay *et al.*, Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **292**, R373 (Jan, 2007).

22. G. Valdes *et al.*, Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta* **27**, 200 (Feb-Mar, 2006).
23. X. Xie, J. Chen, X. Wang, F. Zhang, Y. Liu, Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. *Life sciences* **78**, 2166 (Apr 4, 2006).
24. C. M. Ferrario, Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* **47**, 515 (Mar, 2006).
25. N. M. Kaplan, R. W. Gifford, Jr., Choice of initial therapy for hypertension. *Jama* **275**, 1577 (May 22-29, 1996).
26. C. M. Ferrario *et al.*, Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* **18**, III126 (Nov, 1991).
27. M. J. Katovich, J. L. Grobe, M. K. Raizada, Angiotensin-(1-7) as an antihypertensive, antifibrotic target. *Current hypertension reports* **10**, 227 (Jun, 2008).
28. K. B. Brosnihan *et al.*, Enhanced renal immunocytochemical expression of ANG-(1-7) and ACE2 during pregnancy. *Hypertension* **42**, 749 (Oct, 2003).
29. Z. Su, J. Zimpelmann, K. D. Burns, Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney international* **69**, 2212 (Jun, 2006).
30. L. J. Greene, A. C. Spadaro, A. R. Martins, W. D. Perussi De Jesus, A. C. Camargo, Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* **4**, 178 (Mar-Apr, 1982).
31. M. T. Schiavone, R. A. Santos, K. B. Brosnihan, M. C. Khosla, C. M. Ferrario, Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 4095 (Jun, 1988).
32. C. M. Ferrario, M. C. Chappell, E. A. Tallant, K. B. Brosnihan, D. I. Diz, Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* **30**, 535 (Sep, 1997).
33. K. Kumamoto, T. A. Stewart, A. R. Johnson, E. G. Erdos, Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) in human lung and cultured cells. *The Journal of clinical investigation* **67**, 210 (Jan, 1981).
34. R. A. Santos *et al.*, Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8258 (Jul 8, 2003).
35. E. Kostenis *et al.*, G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* **111**, 1806 (Apr 12, 2005).
36. W. E. M. D. Hurford, F.C.C.M., M. D. Alan Jay Schwartz, M.S.Ed, Ed. (American Society of Anesthesiologists, Boston, Massachusetts, 2003), vol. 31, pp. 81-91.
37. I. Harukuni, A. Bhardwaj, Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic clinics* **24**, 1 (Feb, 2006).
38. L. S. Goodman, Alfred Gilman, Laurence L. Brunton, John S. Lazo, and Keith L. Parker, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. (New York, ed. 11a, 2006).
39. W. Chan, M. Wang, J. D. Kopple, M. E. Swendseid, Citrulline levels and urea cycle enzymes in uremic rats. *The Journal of nutrition* **104**, 678 (Jun, 1974).
40. G. Wu, S. M. Morris, Jr., Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal* **336 ( Pt 1)**, 1 (Nov 15, 1998).
41. M. E. Brosnan, J. T. Brosnan, Renal arginine metabolism. *The Journal of nutrition* **134**, 2791S (Oct, 2004).

42. S. Xiao, R. J. Schmidt, C. Baylis, Plasma from ESRD patients inhibits nitric oxide synthase activity in cultured human and bovine endothelial cells. *Acta physiologica Scandinavica* **168**, 175 (Jan, 2000).
43. H. Li *et al.*, Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **280**, E75 (Jan, 2001).
44. E. I. Closs, F. Z. Basha, A. Habermeier, U. Forstermann, Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the  $\gamma^+$  carrier hCAT-2B. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **1**, 65 (Feb, 1997).
45. K. Ujiiie, J. Yuen, L. Hogarth, R. Danziger, R. A. Star, Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *The American journal of physiology* **267**, F296 (Aug, 1994).
46. C. S. Wilcox *et al.*, Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11993 (Dec 15, 1992).
47. A. Tojo *et al.*, Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **4**, 1438 (Jan, 1994).
48. P. Klatt *et al.*, Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *The Journal of biological chemistry* **271**, 7336 (Mar 29, 1996).
49. R. C. Venema, H. Ju, R. Zou, J. W. Ryan, V. J. Venema, Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *The Journal of biological chemistry* **272**, 1276 (Jan 10, 1997).
50. P. Klatt, K. Schmidt, G. Uray, B. Mayer, Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *The Journal of biological chemistry* **268**, 14781 (Jul 15, 1993).
51. B. R. Crane *et al.*, Structures of the N(omega)-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins. *Biochemistry* **39**, 4608 (Apr 25, 2000).
52. P. J. Andrew, B. Mayer, Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research* **43**, 521 (Aug 15, 1999).
53. K. M. Channon, Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* **14**, 323 (Nov, 2004).
54. E. W. Albrecht, C. A. Stegeman, P. Heeringa, R. H. Henning, H. van Goor, Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of pathology* **199**, 8 (Jan, 2003).
55. J. A. Panza, Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clinical cardiology* **20**, II (Nov, 1997).
56. J. F. Arnal, A. T. Dinh-Xuan, M. Pueyo, B. Darblade, J. Rami, Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **55**, 1078 (Jul, 1999).
57. O. Feron, C. Dessy, S. Moniotte, J. P. Desager, J. L. Balligand, Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of clinical investigation* **103**, 897 (Mar, 1999).
58. C. K. Fujihara *et al.*, Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**, 2278 (Sep, 2002).

59. L. K. Lee, T. W. Meyer, A. S. Pollock, D. H. Lovett, Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *The Journal of clinical investigation* **96**, 953 (Aug, 1995).
60. M. Hollmen, Diagnostic test for early detection of acute kidney injury. *Expert review of molecular diagnostics* **11**, 553 (Jul, 2011).
61. D. R. Jacob, Acute renal failure. *Indian Journal of Anaesthesia* **47**, 367 (2003).
62. F. Cosentino, C. Chaff, M. Piedmonte, Risk factors influencing survival in ICU acute renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **9 Suppl 4**, 179 (1994).
63. C. M. Erley *et al.*, Plasma clearance of iodine contrast media as a measure of glomerular filtration rate in critically ill patients. *Critical care medicine* **29**, 1544 (Aug, 2001).
64. K. E. Kim, G. Onesti, O. Ramirez, A. N. Brest, C. Swartz, Creatinine clearance in renal disease. A reappraisal. *British medical journal* **4**, 11 (Oct 4, 1969).
65. R. Bellomo, C. Ronco, J. A. Kellum, R. L. Mehta, P. Palevsky, Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**, R204 (Aug, 2004).
66. J. F. M. B. Antonio Méndez Durán, Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante* **31**, 07 (2010).
67. K. Totsune *et al.*, Upregulation of atrial natriuretic peptide gene expression in remnant kidney of rats with reduced renal mass. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **9**, 1613 (Sep, 1998).
68. W. E. Hoy *et al.*, Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension* **17**, 258 (May, 2008).
69. J. P. Cooke, Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**, 2032 (Sep, 2000).
70. P. Vallance, A. Leone, A. Calver, J. Collier, S. Moncada, Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339**, 572 (Mar 7, 1992).
71. L. A. Sechi, E. F. Grady, C. A. Griffin, J. E. Kalinyak, M. Schambelan, Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *The American journal of physiology* **262**, F236 (Feb, 1992).
72. M. Mishina, T. Watanabe, Development of hypertension and effects of benazepril hydrochloride in a canine remnant kidney model of chronic renal failure. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **70**, 455 (May, 2008).
73. O. H. Lowry, Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 265 (1951).
74. A. J. Gawron, S. M. Lunte, Detection of neuropeptides using on-capillary copper complexation and capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* **21**, 3205 (Sep, 2000).
75. L. G. Cervantes-Perez *et al.*, Endothelial nitric oxide synthase impairment is restored by clofibrate treatment in an animal model of hypertension. *European journal of pharmacology* **685**, 108 (Jun 15, 2012).
76. G. M. Isidoro, La enfermedad coronaria del diabetico. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento. *Española cardiología* **7**, 29H (2007).
77. S. L. y. E. Nava, El endotelio vascular. endotelio e hipertensión vascular. *Órgano oficial de la sociedad castellana de cardiología* **V**, 161 (2003).
78. R. A. Santos, K. B. Brosnihan, D. W. Jacobsen, P. E. DiCorleto, C. M. Ferrario, Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension* **19**, 1156 (Feb, 1992).

# **ANEXO 1**

## **DIETA PARA LAS RATAS**

# Laboratory Rodent Diet

# 5001\*

## DESCRIPTION

Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 70 years.

### Features and Benefits

- **Managed Formulation delivers Constant Nutrition®**
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Formulated for multiple species for single product inventory
- The rodent diet standard for biomedical research

### Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

### Other Versions Available

- 5L0D PicoLab Laboratory Rodent Diet (minimum order required)

## GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	8.0%

## INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, dried beet pulp, fish meal, ground oats, brewers dried yeast, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, dried whey, wheat germ, porcine animal fat preserved with BHA, porcine meat meal, wheat middlings, salt, calcium carbonate, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, vitamin A acetate, folic acid, menadiolone dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, biotin, thiamin mononitrate, nicotinic acid, calcium pantothenate, dl-alpha tocopheryl acetate, vitamin B<sub>12</sub> supplement, riboflavin, ferrous sulfate, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

## FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

**Rats-** All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

**Mice-** Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

**Hamsters-** Adults will eat up to 14 grams per day.

For information regarding shelf life please visit [www.labdiet.com](http://www.labdiet.com).

## CHEMICAL COMPOSITION<sup>1</sup>

### Nutrients<sup>2</sup>

<b>Protein</b> , %	23.9
Arginine, %	1.41
Cystine, %	0.31
Glycine, %	1.21
Histidine, %	0.57
Isoleucine, %	1.14
Leucine, %	1.83
Lysine, %	1.41
Methionine, %	0.67
Phenylalanine, %	1.04
Tyrosine, %	0.71
Threonine, %	0.91
Tryptophan, %	0.29
Valine, %	1.17
Serine, %	1.19
Aspartic Acid, %	2.81
Glutamic Acid, %	4.37
Alanine, %	1.43
Proline, %	1.49
Taurine, %	0.02
<b>Fat (ether extract)</b> , %	5.0
<b>Fat (acid hydrolysts)</b> , %	5.7
Cholesterol, ppm	200
Linoleic Acid, %	1.22
Linolenic Acid, %	0.10
Arachidonic Acid, %	<0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	0.19
Total Saturated Fatty Acids, %	1.56
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.60
<b>Fiber (Crude)</b> , %	5.1
Neutral Detergent Fiber <sup>3</sup> , %	15.6
Acid Detergent Fiber <sup>4</sup> , %	6.7
<b>Nitrogen-Free Extract (by difference)</b> , %	48.7
Starch, %	31.9
Glucose, %	0.22
Fructose, %	0.30
Sucrose, %	3.70
Lactose, %	2.01
<b>Total Digestible Nutrients</b> , %	76.0
<b>Gross Energy, kcal/gm</b>	4.07
<b>Physiological Fuel Value<sup>5</sup>, kcal/gm</b>	3.36
<b>Metabolizable Energy, kcal/gm</b>	3.02
<b>Minerals</b>	
Ash, %	7.0
Calcium, %	0.95
Phosphorus, %	0.66
Phosphorus (non-phytate), %	0.39
Potassium, %	1.18
Magnesium, %	0.21

Sulfur, %	0.36
Sodium, %	0.40
Chloride, %	0.67
Fluorine, ppm	16
Iron, ppm	270
Zinc, ppm	79
Manganese, ppm	70
Copper, ppm	13
Cobalt, ppm	0.90
Iodine, ppm	1.0
Chromium, ppm	1.2
Selenium, ppm	0.30

### Vitamins

Carotene, ppm	2.3
Vitamin K (as menadiolone), ppm	1.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Riboflavin, ppm	4.5
Niacin, ppm	120
Pantothenic Acid, ppm	24
Choline Chloride, ppm	2250
Folic Acid, ppm	7.1
Pyridoxine, ppm	6.0
Biotin, ppm	0.30
B <sub>12</sub> , mcg/kg	50
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D <sub>3</sub> (added), IU/gm	4.5
Vitamin E, IU/kg	42
Ascorbic Acid, mg/gm	—

### Calories provided by:

Protein, %	28.507
Fat (ether extract), %	13.496
Carbohydrates, %	57.996

### \*Product Code

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.
3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.
4. ADF = approximately cellulose and lignin.
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

**LabDiet**  
www.labdiet.com