



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA

*Tesis doctoral*

**Programación fetal de enfermedades  
cardiovasculares y renales:**

**Participación del Sistema Renina Angiotensina  
en un modelo de deficiencia moderada de zinc  
durante la vida fetal y postnatal**

María Natalia Gobetto

Directora: Cristina Teresa Arranz

Directora adjunta: Analía Lorena Tomat

**Año 2018**

**A Martín**

**A mi mamá y mi papá: Norma y Alberto**

**A mis hermanos: Chelo, Guille, Silvi, Caro y Sol**

### **Agradezco profundamente a:**

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por solventar económicamente los trabajos realizados y por haberme otorgado la beca que me permitió llevar a cabo esta tesis.

A la Cátedra de Fisiología y el Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA-CONICET) por permitir realizar este trabajo de Tesis.

A mis directoras, Analía y Cristina, quienes me transmitieron su experiencia, me acompañaron y colaboraron activamente en mi formación profesional. Gracias por todo lo aprendido en estos años y por el apoyo diario.

Al Dr. Hector Fasoli, por su colaboración en la determinación del zinc plasmático, al Dr. Jorge Toblli, por su colaboración en la determinación de las citoquinas pro-inflamatorias y a la Dra. Mariela Gironacci, por su colaboración en las determinaciones de los péptidos.

A mis compañeros del laboratorio 3 y al equipo docente de la cátedra de Fisiología, por el acompañamiento en el trabajo del día a día, por haber pasado lindos momentos de dispersión, de discusión, de aprendizaje. Gracias por estar siempre dispuestos a dar una mano. A ustedes: Dani, Agus, Maru, Franco, Juli, Ro, Caro, Marian, Facu, Manu, Nico, Sofi y Meli.

A mis amigas, personas increíbles, que fui cosechando a lo largo de todos estos años: Mechi, Celes, Juli, Lore, Steffa, Ani, Maru, Pato, Vani, Myr y Masi. Gracias por tantos momentos compartidos, por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento. Gracias por estar siempre.

En especial, le quiero agradecer a Juli, Steffa, Mechi, Lore y Facu por estar a mi lado en los momentos más críticos del desarrollo de esta tesis, por haber sido mi soporte emocional, por darme una mano en todo momento, por sus buenos consejos.

A mis amigos de la vida que a pesar de la distancia siempre se las arreglan para estar presentes. Gracias por el aguante.

A mis abuelos, padres y hermanos, a Mónica y a Melisa; gracias por el amor incondicional, la contención emocional y la energía positiva constante.

A mis sobrinos: Mateo, Guada, Luz, Pilar y Tomás; esos locos bajitos que siempre me sacan una sonrisa con sus ocurrencias y que me remontan a mi infancia. Gracias por tanto amor.

A Martín, mi compañero de ruta con quien comparto el día a día. Gracias por estar en todo momento, por darme una mano cada vez que la necesité, por tu apoyo constante, por darme fuerzas cuando mi voluntad flaqueaba.

Gracias a todos por ser parte de esto, no lo hubiera logrado sin ustedes.

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hipertensión arterial.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Definición, Clasificación, Significancia del Problema.....	2
1.1.2 Regulación de la Presión Arterial.....	4
1.1.3 Fisiopatología de la HTA.....	6
<b>1.2 El Sistema Renina Angiotensina (SRA).....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Eje Clásico del SRA .....	8
1.2.2 Nuevas Vías del SRA .....	11
1.2.3 Vías de formación de Angiotensina II independientes de la ECA.....	14
1.2.4 Efectos no hemodinámicos de la AngII.....	15
1.2.5 SRA tisular .....	19
1.2.6 Desarrollo renal y SRA.....	21
<b>1.3 Programación fetal de enfermedades cardiovasculares y renales.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Diferencias de sexo en modelos de programación fetal de ECV .....	25
<b>1.4 Zinc, un micronutriente esencial .....</b>	<b>29</b>
1.4.1 Deficiencia de Zinc.....	29
1.4.2 Metabolismo del Zinc .....	30
1.4.3 Requerimientos Dietarios y Evaluación del Estado Nutricional del Zinc .	33
1.4.4 Funciones biológicas del Zinc.....	34
1.4.5 Efectos del Déficit de Zinc.....	36

<b>1.5 Antecedentes de Nuestro Laboratorio.....</b>	<b>36</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
2.1.HIPÓTESIS .....	41
2.2.Objetivos generales .....	42
2.3.Objetivos específicos: .....	42
<b>3. MODELO Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>44</b>
3.1 Modelo experimental .....	45
3.2 Protocolo experimental I .....	48
3.3 Determinaciones realizadas: Protocolo I.....	49
3.4 Protocolo experimental II.....	51
3.5 Determinaciones realizadas: Protocolo II.....	52
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>PROTOCOLO I .....</b>	<b>54</b>
4.1 Animales.....	54
4.2 Medición del peso corporal y del consumo de alimento de las ratas madre durante los períodos de gestación y lactancia .....	54
4.3 Medición del peso corporal, la ganancia de peso desde el día 21 hasta el día 81 de vida de las crías, el consumo de alimento y el largo de la tibia.....	55
4.4 Medición de los pesos renales y cardíacos.....	55
4.5 Determinación de la concentración de zinc del alimento y de los sueros de los de las ratas madres y de sus crías .....	56
4.6 Registro de la presión arterial sistólica .....	56

4.7 Evaluación de la morfología renal.....	57
4.7.1 Determinación de los parámetros morfométricos renales.....	58
4.7.2 Evaluación de los depósitos de colágeno en corteza renal con Sirius Red	58
4.7.3 Evaluación de los depósitos de colágeno en corteza renal con tinción tricrómica de Masson .....	59
4.7.4 Determinación de apoptosis o muerte celular programada: Técnica de TUNEL.....	60
4.8 Evaluación del sistema renina angiotensina.....	62
4.8.1 Determinación del contenido de péptidos: AngII y Ang-(1-7) .....	62
4.8.2 Determinación de los niveles de ARNm de ECA, ECA2 y de los receptores AT <sub>1A</sub> y AT <sub>2</sub> .....	63
4.8.3 Determinación de los niveles proteicos de ECA, AT <sub>1</sub> y AT <sub>2</sub> .....	66
4.8.4 Localización y niveles de AngII y de receptor AT <sub>1</sub> por Inmunohistoquímica.....	69
4.9 Determinación de la producción de anión superóxido inducida por NADPH en ventrículo izquierdo .....	70
4.10 Evaluación de la respuesta contráctil de la aorta torácica frente a la AngII ..	71
<b>PROTOCOLO II.....</b>	<b>73</b>
4.11 Animales.....	73
4.12 Preparación e implantación de las bombas osmóticas subcutáneas.....	73
4.13 Registro de la presión arterial sistólica .....	74
4.14 Evaluación de la morfología vascular .....	74
4.14.1 Determinación de los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno perivasculares de las arterias renales corticales .....	74

4.14.2 Determinación de los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno perivasculares de las arterias coronarias del ventrículo izquierdo .....	75
4.14.3 Determinación de los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno perivasculares de la aorta torácica.....	75
4.15 Evaluación de marcadores proinflamatorios (IL-6 y TNF- $\alpha$ ).....	76
4.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	77
4.17 Reactivos .....	79
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1. RESULTADOS: PROTOCOLO I.....</b>	<b>87</b>
5.1.1. Registro del peso corporal, del consumo de alimento y de la concentración de zinc sérica de las ratas madres durante la gestación y la lactancia.....	87
5.1.2. Registro del peso corporal, la longitud de la tibia y la concentración sérica de zinc en crías de 6 días de vida. ....	88
5.1.3. Evaluación de la morfología renal a los 6 días de vida .....	89
5.1.4. Estudio de la participación del SRA renal a los 6 días de vida en las ratas expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y la vida postnatal temprana .....	92
5.1.5. Registro del peso corporal, la longitud de la tibia y la concentración sérica de zinc de las ratas a los 81 días de vida .....	103
5.1.6. Registro de la presión arterial sistólica a los 36, 51, 66 y 81 días de vida .....	104
5.1.7. Estudio de la participación del SRA renal en las ratas machos y hembras expuestas a una deficiencia moderada de zinc a los 81 días de vida .....	106
5.1.8. Estudio del SRA cardíaco en las ratas machos y hembras expuestas a una deficiencia moderada de zinc a los 81 días de vida .....	116



5.1.9. Estudios de reactividad vascular en anillos de aorta torácica de ratas de 81 días de vida .....	124
<b>5.2. RESULTADOS: PROTOCOLO II .....</b>	<b>128</b>
5.2.1. Registro de la presión arterial sistólica .....	128
5.2.2. Evaluación de la morfología y el estado inflamatorio en tejido renal ....	130
5.2.3. Evaluación de la morfología y el estado inflamatorio en tejido cardíaco .....	134
5.2.4. Evaluación de la morfología y el estado inflamatorio en tejido aórtico .	137
5.3 RESUMEN DE RESULTADOS .....	141
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>146</b>
<b>7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>167</b>
<b>8. RESUMEN.....</b>	<b>172</b>
<b>9. ABREVIATURAS .....</b>	<b>176</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>182</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Hipertensión arterial

### 1.1.1 Definición, Clasificación, Significancia del Problema

La Hipertensión Arterial (HTA) es una patología crónica que consiste en el aumento de la presión arterial (PA) sistólica y/o diastólica por encima de los valores establecidos como normales. En 1978, el comité de expertos en HTA perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la definió como una tensión arterial sistólica igual o superior a 140mmHg y/o una tensión diastólica igual o superior a 90mmHg <sup>1</sup>. Esta definición sigue vigente hasta la actualidad como referencian las Guías de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y Sociedad Europea de Hipertensión Arterial (ESH) publicadas en 2013 (Tabla 1). Algunas sociedades como la *American Heart Association* y el *American College of Cardiology* en el año 2017 redefinieron a la HTA como un valor de presión sistólica igual o superior a 130mmHg y una tensión diastólica igual o superior a 80mmHg, reduciendo los valores normales de tensión arterial <sup>2</sup>. Esta definición no ha sido aceptada aún por otras sociedades médicas de la especialidad.

Categoría	Sistólica		Diastólica
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal alta	130-139	y/o	85-89
HTA de grado 1	140-159	y/o	90-99
HTA de grado 2	160-179	y/o	100-109
HTA de grado 3	≥ 180	y/o	≥ 110
HTA sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

HTA: hipertensión arterial.

\*La categoría se define por el valor más alto de presión arterial, ya sea sistólica o diastólica. La HTA sistólica aislada debe clasificarse en grados 1, 2 o 3 según los valores de presión arterial sistólica en los intervalos indicados.

**Tabla 1:** Clasificación de los valores de presión arterial según las Guías de la Sociedad Europea de Hipertensión Arterial y Sociedad Europea de Cardiología. Extraído de Guía de práctica clínica de la ESH/ESC 2013 para el manejo de la hipertensión arterial.

Se clasifica a la HTA como primaria o secundaria. La primaria, también llamada hipertensión esencial (HTAe), afecta aproximadamente al 95% de los hipertensos y se considera idiopática. La HTAe constituye una enfermedad silenciosa, debido a la ausencia de síntomas y falta de consecuencias graves a corto plazo, pero que lleva a grandes alteraciones en órganos blanco en el largo plazo, produciendo daño

cardiovascular, renal y cerebral<sup>3</sup>. Por el contrario, la HTA secundaria se presenta como signo de otro proceso patológico subyacente, por lo que posee una causa asignable. Puede desarrollarse como consecuencia de enfermedades renales (enfermedad poliquística, nefropatía crónica, vasculitis renal), endocrinológicas (acromegalia, síndrome de Cushing, hipo e hipertiroidismo, hiperaldosteronismo, feocromocitoma), cardiovascular (rigidez de la aorta, o coartación), o neurológica (psicogénica, apnea del sueño)<sup>3</sup>.

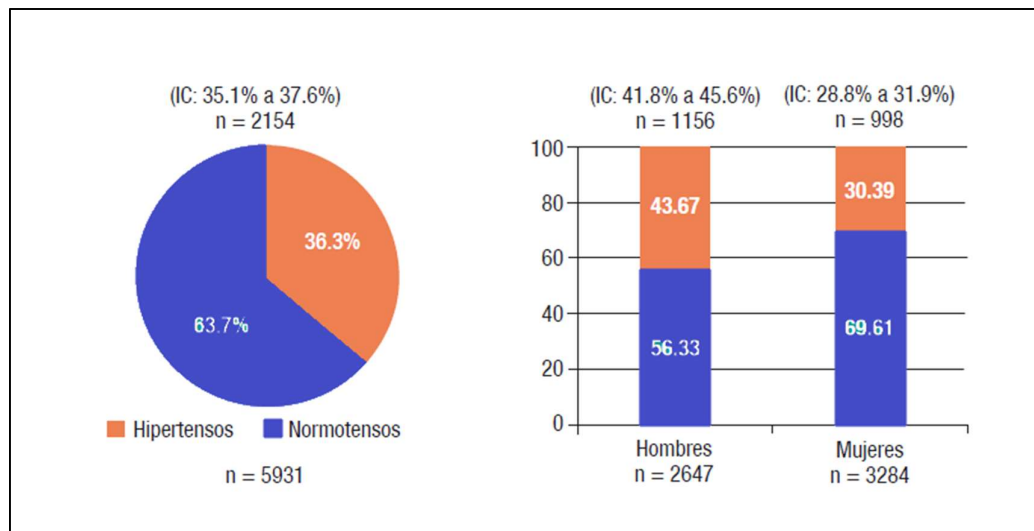
La HTA es uno de los factores de riesgo más prevalentes causantes de disfunción endotelial, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal. Esta importante relación y dependencia entre los eventos mencionados y la HTA la posiciona como una de las afecciones de mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial<sup>4</sup>.

La HTA rara vez produce síntomas en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad y muchos pacientes hipertensos permanecen sin diagnóstico durante años. A su vez, muchos pacientes, en los que se diagnostica, no tienen acceso al tratamiento adecuado por lo que no logran controlar con éxito su enfermedad en el largo plazo. La prevención, el rastreo, la detección temprana y el tratamiento apropiado de la HTA producen importantes beneficios sanitarios, sociales y económicos. El control adecuado de la HTA reduce la incidencia de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca en un 40%, 25% y 50%, respectivamente.<sup>5-7</sup>

Según datos de la OMS cerca de 1.000 millones de personas se encuentran afectadas por esta enfermedad (constituyendo el 40% de los adultos mayores de 25 años). De este número se estima que un tercio desconoce que es hipertenso, y de aquellos con diagnóstico, aproximadamente un tercio no logra un control adecuado de la PA a pesar de la instauración del tratamiento adecuado. Se estima que la HTA causa aproximadamente nueve millones de muertes por año<sup>7</sup>.

En el año 2015 se realizó en la Argentina el segundo estudio RENATA-2 (Registro Nacional de Hipertensión Arterial Estudio 2) llevado a cabo por la Sociedad Argentina de Cardiología (SAC) y la Federación Argentina de Cardiología (FAC) para establecer un diagnóstico de situación respecto del conocimiento, tratamiento y control de la HTA en nuestro país. Se encuestaron a 5931 individuos pertenecientes a 25 ciudades en 18 provincias. La edad promedio de la población muestreada fue de 43 años y el 44,6% fueron hombres<sup>8</sup>. Los resultados obtenidos de este estudio revelaron que la prevalencia de HTA fue del 36,3%, y fue mayor en hombres que en mujeres

(Figura 1) y más alta que la prevalencia detectada en el estudio RENATA realizado en el 2009 (33,5%)<sup>9</sup>. Este aumento de prevalencia, en línea con los últimos informes de la OMS para la región de las Américas, es un problema compartido con el resto del mundo: se lo atribuye al crecimiento y envejecimiento poblacional, al consumo de dietas poco saludables, al exceso de peso, al consumo abusivo de bebidas alcohólicas, al aumento del sedentarismo y/o la exposición prolongada a factores estresantes<sup>10</sup>.



**Figura 1:** Prevalencia de hipertensión arterial en Argentina. Estudio RENATA-2.

Dados estos datos alarmantes, resulta de sumo interés el conocimiento de las causas y mecanismos por los que se produce la HTA y las enfermedades asociadas a ella para elaborar y aplicar políticas de salud dirigidas a reducir la mortalidad y la discapacidad que generan estas enfermedades no transmisibles. La prevención, el diagnóstico temprano y la instauración del tratamiento adecuado para lograr el control de la HTA son las piedras angulares para cumplir ese objetivo.

### 1.1.2 Regulación de la Presión Arterial

Los valores absolutos de la PA varían con la edad, el sexo y la raza. Mantener niveles normales de la PA, tanto sistólica como diastólica, es fundamental para el funcionamiento eficiente de órganos vitales como el corazón, el cerebro y los riñones, y para la salud y el bienestar en general<sup>11</sup>.

El valor de la PA está determinado por dos variables principalmente: el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica. Sus valores exhiben una distribución normal en la población general que indica que es el efecto neto de una multitud de factores independientes, cada uno con un pequeño efecto acumulativo <sup>12</sup>.

El gasto cardíaco depende en parte del volumen sanguíneo, que está determinado por la homeostasis del sodio y agua corporal total. El riñón desempeña un rol principal en la regulación de la homeostasis hidrosalina a través del sistema renina angiotensina (SRA). La angiotensina II (AngII) ejerce parte de su efecto sobre la volemia por efectos directos y por su capacidad para estimular la secreción de aldosterona, que a su vez aumenta la reabsorción de sodio en el túbulo distal. Por otro lado, cuando disminuye el flujo sanguíneo renal, la reducción en la tasa de filtrado glomerular (TFG) activa la función del SRA, con el consiguiente aumento de la reabsorción de sodio en los túbulos proximales por acción de la AngII, lo que resulta en la conservación de la homeostasis del sodio y la expansión del volumen sanguíneo. Los riñones también son el órgano diana de los péptidos natriuréticos. Estos péptidos son secretados por el miocardio auricular y ventricular en respuesta a la expansión de volumen sanguíneo e inhiben la reabsorción de sodio en los túbulos distales: de ese modo favorecen la excreción de sodio y agua. Además, cuando la función excretora renal se encuentra alterada, el aumento de la PA representa un mecanismo compensador que ayuda a restaurar el equilibrio de líquidos y electrolitos <sup>3</sup>.

La resistencia vascular periférica está determinada principalmente a nivel arteriolar, y es influenciada por factores neurales y humorales. El tono vascular normal refleja un equilibrio entre las influencias humorales y neurogénicas vasoconstrictoras (entre ellas AngII, catecolaminas y endotelinas) y vasodilatadoras (como cininas, prostaglandinas y óxido nítrico (NO)). Los vasos de resistencia también exhiben fenómenos de autorregulación, de modo que el aumento local del flujo sanguíneo induce vasoconstricción refleja para proteger al órgano de la hipertensión tisular o vasodilatación a través de factores vasodilatadores tisulares cuando el flujo disminuye dependiendo de la función o demanda metabólica del tejido diana. <sup>3,13</sup>

### 1.1.3 Fisiopatología de la HTA

En 1960, Paige publicó la Teoría del Mosaico de la HTA (*Mosaic Theory of Hypertension*). Propone que las complejas interacciones entre la genética, el medio ambiente y las alteraciones adaptativas neurales, mecánicas y hormonales son las que determinan la aparición de la HTA, a través de sus influencias sobre el gasto cardíaco y/o la resistencia periférica <sup>14</sup>

Los factores genéticos desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la HTA, habiéndose identificado un componente de heredabilidad del 30-50% <sup>11</sup>. En la actualidad el desarrollo de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, sigla en inglés de *Genome Wide Association Study*), se han permitido asociar ciertos polimorfismos de nucleótido único (SNPs, sigla en inglés para *single nucleotide polymorphism*) con el desarrollo de HTA <sup>12</sup>. Padmanabhan y col. publicaron en 2015 una actualización del diagrama de Paige (Figura 2) proponiendo a la HTA como una patología de causa multifactorial que incluye alteraciones monogénicas y poligenéticas, renales, hemodinámicas, endócrinas, humorales, neuronales, adaptativas y ambientales, entre otras.

Se han identificado polimorfismos de diversos genes asociados al desarrollo de HTA, incluyendo a los genes del angiotensinógeno, de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), del receptor AT<sub>1</sub>, de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y del receptor del péptido natriurético tipo B <sup>15</sup>. A pesar del esfuerzo de los investigadores para intentar dilucidar la génesis de la HTA, los estudios GWAS sólo explican una proporción baja de la heredabilidad de esta patología, restando aún el estudio de un gran porcentaje de genes desconocidos que podrían participar como causales de HTA. Esta brecha en la información se denomina actualmente como “heredabilidad perdida” <sup>12,16</sup>. La herencia de patrones epigenéticos, es decir marcas en el ADN heredadas por interacción con el ambiente, podría explicar en parte la heredabilidad perdida <sup>17</sup> junto con la presencia de variantes raras <sup>18</sup>. En resumen, la HTA esencial puede ser causa del efecto combinado de mutaciones o polimorfismos en varios *loci* genéticos que interactúan con el medio ambiente.

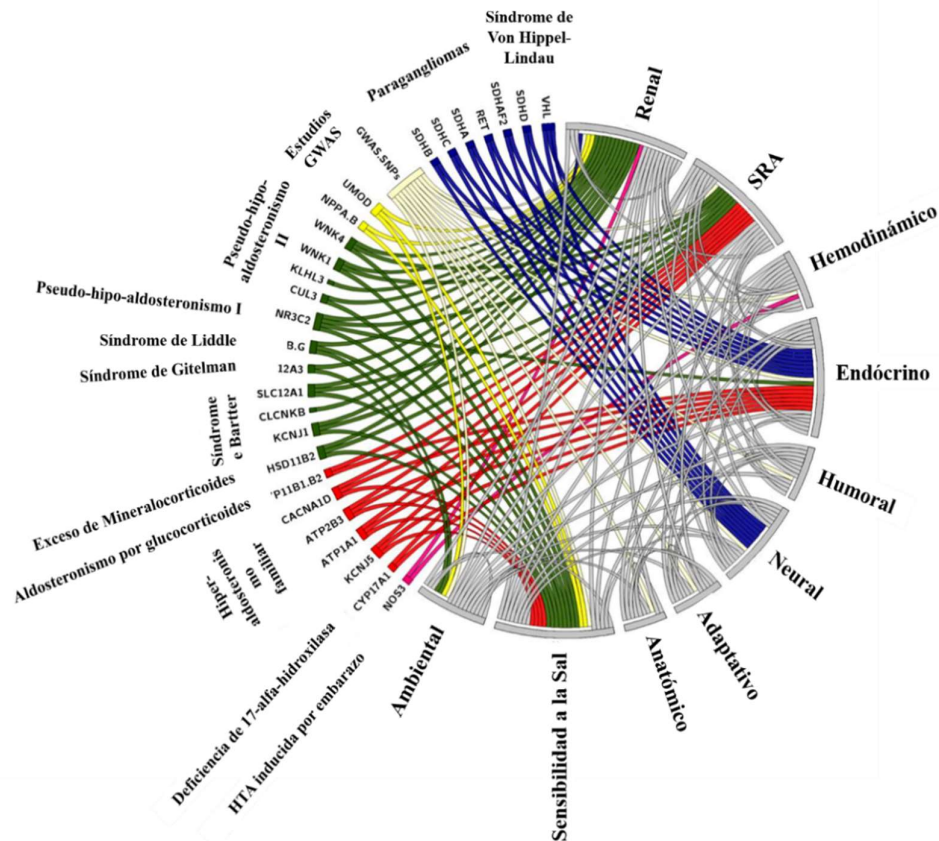


Figura 2: Actual teoría del mosaico para la HTA (*Mosaic Theory of Hypertension*). Modificado de Padmanabhan y col., 2015.

De los factores de riesgo medioambientales, los principales factores de riesgo modificables (relacionados al comportamiento) identificados como contribuyentes al desarrollo de la HTA son la dieta inadecuada (especialmente aquellas con excesiva ingesta de sal y de grasas, o con deficiencia de ciertos micronutrientes), el tabaquismo, la obesidad, el sedentarismo, el exceso de consumo de alcohol y el estrés<sup>7,19</sup>.

Dada esta interacción entre los factores genéticos y ambientales como causa de HTA, existe actualmente un gran interés en estudiar la relación entre el desarrollo fetal y la nutrición en épocas tempranas de la vida para determinar su impacto en la aparición de HTA y enfermedades cardiovasculares (ECV). Se ha demostrado que el estado nutricional durante periodos críticos al comienzo de la vida influye en la estructura y función corporal en la vida adulta. Esta relación ha dado lugar al desarrollo de la epigenética, especialidad que estudia la variación en la expresión genética generada por metilaciones del ADN en regiones ricas en dinucleótidos de citosina fosfato-guanina que generalmente se encuentran en regiones promotoras implicadas en la regulación de la transcripción génica, así como también por modificaciones de



histonas y microARN. Los cambios epigenéticos secundarios a cambios ambientales pueden persistir en la vida adulta y aumentar la predisposición a enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Los cambios epigenéticos también pueden explicar por qué los insultos del desarrollo en una generación pueden tener consecuencias en generaciones posteriores <sup>11,20</sup>.

## **1.2 El Sistema Renina Angiotensina (SRA)**

El SRA es un sistema complejo que desempeña un papel importante en el control de las funciones cardiovasculares, renales y cerebrales <sup>21,22</sup>. Juega un papel integral en la preservación de la estabilidad hemodinámica y en la regulación de la fisiología cardiovascular, controlando la PA y la homeostasis hidrosalina.

El primer eje del SRA que se caracterizó fue el eje en el que la AngII, sintetizada a partir de la AngI por la ECA, interactuaba con el receptor AT<sub>1</sub> para originar respuestas hemodinámicas que se resumen en vasoconstricción y retención hidrosalina. Sin embargo, en las últimas décadas se han caracterizado los actores principales de un eje que ejerce efectos contrarreguladores, que constituyen los nuevos péptidos y enzimas del SRA, configurando un eje vasodilatador y natriurético. Sus características serán detalladas a continuación.

### **1.2.1 Eje Clásico del SRA**

Según el concepto clásico el SRA consiste en una cascada proteolítica de péptidos que actúan secuencialmente. El SRA ha sido considerado como un sistema hormonal circulante que comienza con la liberación de renina a la circulación, lo que desencadena la producción sistémica de un péptido presor, la AngII <sup>23,24</sup>. Las células yuxtglomerulares del riñón constituyen un sitio fundamental de síntesis, depósito y liberación de renina.

La renina es una proteasa aspártica que se sintetiza y se almacena en gránulos citoplasmáticos de las células epiteliales de la pared de la arteriola aferente <sup>25</sup>. El triángulo delimitado por las arteriolas aferente y eferente, y la mácula densa, constituye el aparato yuxtglomerular <sup>26</sup>. La mácula densa está formada por un grupo de células modificadas del túbulo distal de la nefrona capaces de detectar cambios en la concentración de sodio del líquido tubular renal. Estas células sintetizan pre-prorenina, la cual es transportada al retículo endoplásmico, donde es clivada y convertida en

prorenina. La prorenina es inactiva por la presencia de un pro-segmento de 43 aminoácidos que obstruye la hendidura donde se encuentra el sitio catalítico <sup>25</sup>. Esta puede ser activada a renina por proteólisis a cargo de la catepsina B o convertasa 1, las cuales clivan dicho pro-segmento. También presenta actividad por vías no proteolíticas mediante cambios del pH o de la temperatura, o a través del receptor de renina-prorenina (RPR) que induce un cambio conformacional en la prorenina que expone su sitio catalítico <sup>27</sup>. La prorenina puede ser también liberada a la circulación como tal <sup>25,28</sup>.

La liberación de renina es desencadenada por diferentes estímulos: la disminución del flujo sanguíneo en la arteriola aferente del glomérulo renal, censado por los barorreceptores, la disminución de la concentración de sodio en el líquido tubular censada por la mácula densa, la estimulación simpática a través de receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos localizados en las células yuxtglomerulares, y factores locales como catecolaminas, prostaciclina y la prostaglandina E <sup>25</sup>. Existen también factores humorales que, como consecuencia de un aumento en el calcio intracelular inhiben la liberación de renina, como la AngII y la endotelina <sup>25,29</sup>.

Con la liberación de renina a la circulación se activa una cascada enzimática que lleva a la producción de la Ang II <sup>24</sup>. El hígado sintetiza y libera a la circulación al angiotensinógeno, sustrato de la renina. Es una  $\alpha$ 2-globulina que contiene en su extremo N-terminal el decapeptido Angiotensina I (AngI). Por acción proteolítica de la renina sobre el angiotensinógeno, este es liberado a la circulación <sup>30</sup>. En el paso siguiente la ECA, una dipeptidil carboxipeptidasa ubicada en la membrana de las células endoteliales, hidroliza a la AngI obteniéndose el octapéptido AngII <sup>31</sup>. Además de mediar el clivaje de AngI en AngII, la ECA hidroliza una variedad de otros polipéptidos, incluyendo la bradiquinina, encefalinas y sustancia P.

La AngII es el componente bioactivo principal del SRA. Este péptido interactúa con receptores específicos AT<sub>1</sub> a través de los cuales puede producir vasoconstricción, aumento en la fuerza contráctil del corazón, estimulación del sistema nervioso simpático, y aumento en la reabsorción de sodio y agua (a través de una vía directa por su efecto sobre las células del túbulo contorneado proximal y a través de una de dos vías indirectas, la primera involucra la inducción en la síntesis de aldosterona en la glándula suprarrenal y la segunda la liberación de hormona antidiurética (arginina-vasopresina) por la neurohipófisis), entre otros <sup>23</sup>. En conjunto, estos efectos llevan a un aumento de la PA. De esta manera, el SRA constituye un mecanismo hormonal para la regulación de la PA y la conservación de la volemia.

Diversos autores han comprobado que la estimulación del SRA y la elevación de los niveles de AngII por períodos prolongados producen efectos maladaptativos sobre sus órganos diana <sup>23</sup>. En el sistema vascular la exposición prolongada a niveles aumentados de AngII induce hiperplasia del músculo liso, aumento en los componentes de la matriz extracelular y mayor respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores, mientras que a nivel cardíaco induce hipertrofia del miocardio que puede llevar a la insuficiencia cardíaca <sup>32,33</sup>. A nivel renal la estimulación crónica por niveles aumentados de AngII induce un aumento en la reabsorción tubular de sodio y agua, y tienen efectos profibróticos <sup>34,35</sup>. A nivel del sistema nervioso central se ha vinculado a la AngII con una hiperactivación del sistema nervioso autónomo simpático <sup>36</sup>.

Los receptores AT<sub>1</sub> pertenecen a la familia de los receptores asociados a proteína G (RAPG) <sup>37</sup>. En roedores han sido descritos dos subtipos de receptores AT<sub>1</sub>: el AT<sub>1A</sub> y el AT<sub>1B</sub>. Estos tienen una homología del 95% en su secuencia de aminoácidos y son indistinguibles farmacológica y funcionalmente <sup>38</sup>. La unión de la AngII a receptores AT<sub>1</sub> activa diversas vías de señalización. Las más importantes para mencionar son la vía de la fosfolipasa C (PLC) cuyo efecto final es el aumento de la concentración de calcio intracelular y activación de la proteinquinasa C (PKC); la vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que estimula la producción de prostaglandinas y eicosanoides; y el sistema de tirosinas quinasa que activa la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (vía de las MAPKs) regulando la expresión genética y la transcripción proteica a nivel nuclear <sup>37</sup>.

La AngII puede también unirse al receptor AT<sub>2</sub>, mediando efectos contrarios a los descritos por activación del receptor AT<sub>1</sub>. Es decir, induciendo vasodilatación, diuresis y natriuresis <sup>39</sup>. El receptor AT<sub>2</sub> tiene una estructura similar al receptor AT<sub>1</sub> y también pertenecería a la familia de los RAPGs, aunque su señalización mediante unión a proteína G es hoy discutido <sup>40</sup>. Los niveles proteicos del receptor AT<sub>2</sub> son bajos en los tejidos adultos por lo que la mayor parte de los efectos de la AngII son mediados por la activación receptores AT<sub>1</sub>, que son más numerosos <sup>39,41</sup>. Sin embargo, el contenido proteico del receptor AT<sub>2</sub> se incrementa en condiciones patológicas como la HTA, la aterosclerosis o el infarto de miocardio <sup>37</sup>. Cuando la AngII se une al receptor AT<sub>2</sub> induce vasodilatación y natriuresis por un mecanismo que involucra la síntesis de bradiquinina, NO, y nucleótido guanidina monofosfato cíclico (GMPc) <sup>39,42</sup>. Se ha demostrado que el receptor AT<sub>2</sub> antagoniza el efecto presor inducido por la activación del receptor AT<sub>1</sub> mediante la formación de un heterodímero receptor AT<sub>1</sub>-receptor AT<sub>2</sub> <sup>43</sup>.

### 1.2.2 Nuevas Vías del SRA

La AngII no es el único componente bioactivo del SRA, otros péptidos derivados del angiotensinógeno con actividad biológica han sido descritos, los cuales tienen efectos biológicos similares, diferentes u opuestos a los descritos para la AngII (figura 3), <sup>24,44,45</sup>. La AngIII, formada a partir de AngII por acción de la aminopeptidasa A, es un péptido con actividad biológica similar a las de la AngII <sup>46</sup>. A nivel del sistema nervioso central actúa como un agente presor tan potente como la AngII por estimulación de los receptores AT<sub>1</sub>, mientras que a nivel periférico induce natriuresis y diuresis por activación de los receptores AT<sub>2</sub>. La AngIII también estimula la producción de aldosterona, la generación de mediadores pro-inflamatorios, y el depósito de proteínas en la matriz extracelular <sup>47-49</sup>.

La AngIV se genera a partir de la AngIII por la actividad catalítica de la aminopeptidasa N, y directamente de la AngII por la actividad de la aminopeptidasa D. La AngIV aumenta el flujo sanguíneo renal, induce vasodilatación y mejora la función cardíaca <sup>24,50</sup>. La AngIV también ejerce efectos a nivel del sistema nervioso central: mejora el aprendizaje y la memoria, y protege contra la isquemia cerebral. Tiene además efectos anticonvulsivantes y antiepileptogénicos <sup>44</sup>. Las acciones de la AngIV están mediadas a través de la estimulación del receptor AT<sub>4</sub>, una aminopeptidasa de membrana regulada por insulina (IRAP, de *insulin regulated aminopeptidase*) <sup>51</sup>. IRAP puede actuar como un receptor típico que transduce la información a través de la membrana celular <sup>24</sup>. Sin embargo, también se ha descrito que la AngIV media sus efectos centrales mediante la inhibición de IRAP, aumentando la vida media de la hormona antidiurética, la oxitocina, la somatostatina y la colecistoquinina, todos sustratos de IRAP, que mejoran parámetros asociados con la cognición <sup>24</sup>.

La Angiotensina-(1-12) (Ang-(1-12)) se encuentra en el plasma y en varios tejidos de ratas Wistar (intestino delgado, corazón, la aorta y el riñón). Es un péptido de 12 aminoácidos derivado de angiotensinógeno <sup>52-54</sup>. La administración periférica o central de Ang-(1-12) induce en la rata un aumento en la PA y dicha respuesta presora es bloqueada por la administración de inhibidores de la ECA (IECA) o antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> <sup>52,55</sup>. El precursor de la Ang-(1-12) es el angiotensinógeno, y se obtiene a través de un clivaje independiente de renina, funcionando como un camino alternativo a la vía clásica. <sup>56,57</sup> (Figura 3). A nivel sistémico, la ECA convierte la Ang-(1-12) en AngI y posteriormente en AngII. En la corteza renal la neprelisina (NEP, de *neutral propil endopeptidase*) convierte la Ang-(1-12) al heptapéptido Angiotensina-

(1-7) y a Angiotensina V de manera directa, o a través de la formación previa de AngI<sup>57</sup>. En la circulación, la síntesis de la AngI dependiente de renina está favorecida por sobre la síntesis de AngI a partir de la Ang-(1-12)<sup>57</sup>. Sin embargo, esto puede invertirse a nivel tisular dependiendo de la expresión local de las correspondientes proteasas.

En 2007, Jankowski y col. identificaron en el plasma humano un octapéptido vasoconstrictor derivado de la AngII y lo denominaron Angiotensina A. La A representa alanina, ya que la secuencia de aminoácidos de la AngA difiere de la AngII sólo en el primer aminoácido: alanina en lugar de aspártico<sup>58</sup>. La AngA puede unirse a receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> y media efectos vasoconstrictores e hipertensores, aunque con una menor potencia<sup>45</sup>.

En el año 2000 fue reportada una enzima homóloga a la ECA, la ECA2<sup>59</sup>. La ECA2 es una proteína integral de membrana que expone su sitio catalítico a los péptidos circulantes<sup>31</sup>. Es una carboxipeptidasa que cliva a la AngII generando el heptapéptido bioactivo Angiotensina-(1-7). La ECA2 también tiene como sustrato a la AngI para generar Angiotensina-(1-9), aunque con una eficiencia enzimática 400 veces menor<sup>60</sup>. Esta última puede ser convertida mediante clivaje por ECA o NEP en Ang-(1-7)<sup>46</sup>. La NEP es una metaloproteasa zinc dependiente, ubicada en la membrana plasmática y distribuida de manera ubicua en diferentes tejidos<sup>61</sup> y tiene la capacidad de generar Ang-(1-7) independientemente de la ECA y de la ECA2 a partir de la AngI. Otras enzimas como la Thimet oligopeptidasa (TOP) y la prolilendopeptidasa (PEP) son fuentes de Ang-(1-7) por vías independientes de ECA. Tanto la Ang-(1-7) como la Ang II pueden, a su vez, ser generadas a partir de angiotensinógeno mediante una vía independiente de renina, a partir de la Ang-(1-12)<sup>46</sup> (Figura 3). La Ang-(1-7) es degradada por la ECA al fragmento inactivo Angiotensina-(1-5)<sup>62</sup> y por otras peptidasas a Angiotensina-(3-7)<sup>46,63</sup>.

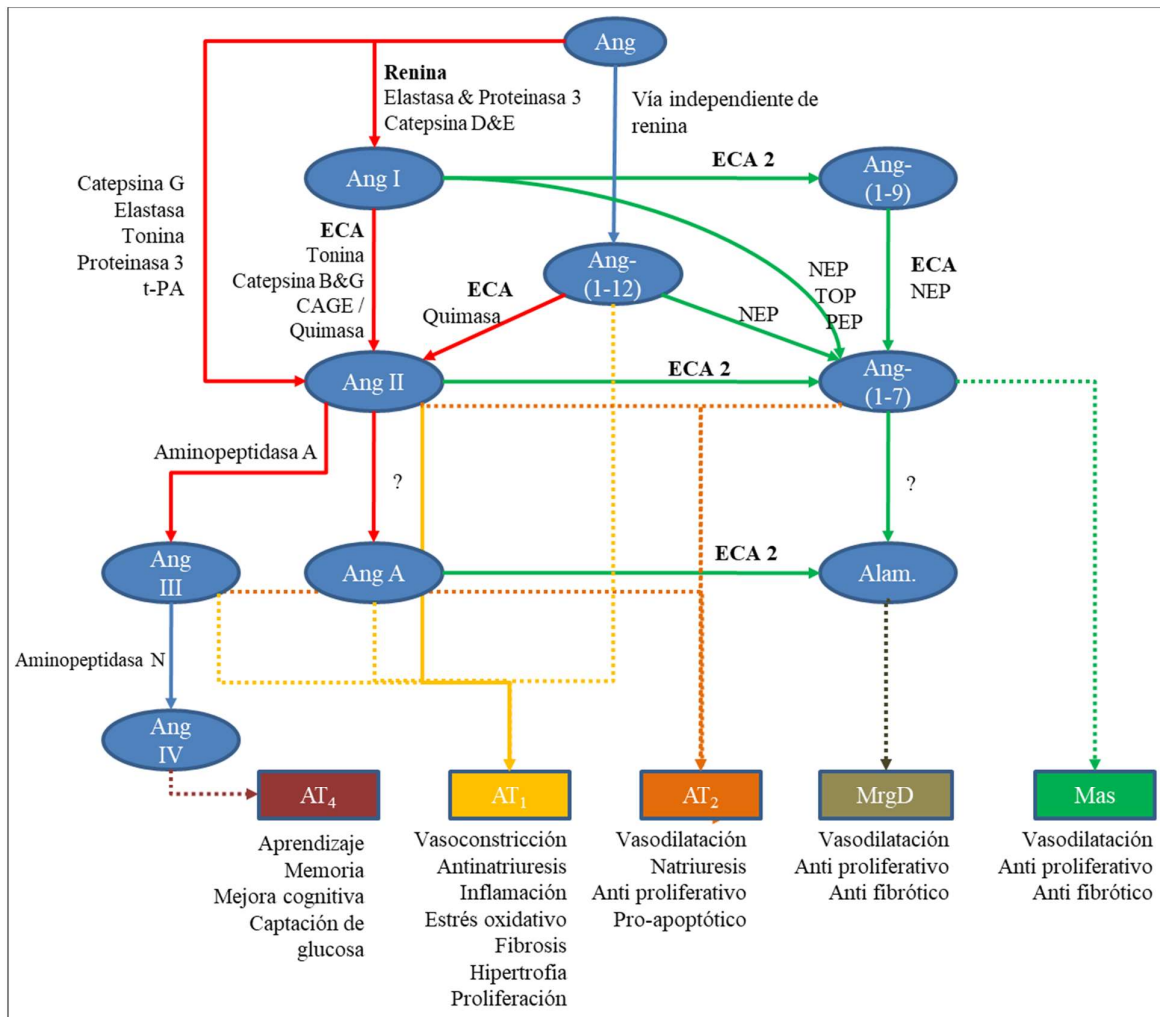
La Ang-(1-7) se une a su receptor específico, el receptor Mas de la familia de los RAPG<sup>64</sup>. Contrario a los efectos de la AngII cuando se une al receptor AT<sub>1</sub>, la Ang-(1-7) unida al receptor Mas media efectos vasodilatadores, anti-inflamatorios, anti-proliferativos, anti-trombóticos, hipotensores, cardio, cerebro y renoprotectores<sup>24,44,65-67</sup>. A pesar de que se ha atribuido capacidad a la Ang-(1-7) para mediar efectos a través del receptor AT<sub>2</sub> en tejido cerebral<sup>68</sup>, experimentos recientes no han aportado datos concluyentes en relación a sus efectos sobre el sistema cardiovascular. En los últimos años se ha observado que el bloqueo del receptor AT<sub>2</sub> con PD123319, utilizado en experimentos de reactividad vascular con Ang-(1-7), es un inhibidor competitivo en la unión de la alamandina con el receptor Mas, demostrando la abolición del efecto

vasodilatador de la alamandina en anillos de aorta en ratones knock-out para el receptor AT<sub>2</sub>. También se ha demostrado que la Ang-(1-7) mantiene su efecto hipotensor en ratones knock-out para los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Esto sugiere que los efectos cardiovasculares y renales de la Ang-(1-7) son mediados a través del receptor Mas, y no a través del receptor AT<sub>2</sub> <sup>66</sup>.

En los últimos años se adjudicaron efectos biológicos a otras Angiotensinas consideradas previamente como inactivas. Entre ellas la Ang-(3-7) cumple funciones importantes en el cerebro, actuando como un neuromodulador e induce un aumento en la PA en ratas que no depende de la activación del receptor AT<sub>1</sub> <sup>69</sup>.

La Ang-(1-9) puede ser convertida a Ang-(1-7) por la ECA y otras endopeptidasas <sup>70-72</sup> (Figura 3) y media efectos anti-proliferativos a través del receptor AT<sub>2</sub> <sup>71,73</sup>, aunque su afinidad por este receptor es 100 veces menor que el de la Ang II <sup>72,73</sup>. La Ang-(1-9) ejerce efectos protectores contra la remodelación cardíaca inducida por Ang II, noradrenalina, HTA e hiperglucemia, por su interacción directa con el receptor AT<sub>2</sub> o a través de su transformación en Ang-(1-7) <sup>74</sup>.

Otro miembro del SRA recientemente descrito es la alamandina <sup>75,76</sup> que puede ser originado por dos vías, a partir de la Ang-(1-7) o a partir de la AngA <sup>45</sup> (Figura 3). La alamandina se une a los receptores MrgD (MrgD, de *Mas related G protein coupled receptor*) y produce efectos similares a los ejercidos por la Ang-(1-7) <sup>75</sup>. La AngA y la AngII se sitúan en un "cruce" del sistema, ya que pueden tener efecto vasoconstrictor y proliferativo en forma directa, o desencadenar efectos opuestos a través de su conversión en alamandina o Ang-(1-7) respectivamente, a cargo de la ECA2 (Figura 3).



**Figura 3:** Esquematización de las vías del sistema renina-angiotensina, con sus péptidos, enzimas y receptores principales. Modificado de Gironacci y cols, 2014. Alam. = alamandina.

### 1.2.3 Vías de formación de Angiotensina II independientes de la ECA

Existen caminos alternativos de transformación de la AngI en AngII que no requieren la presencia de la ECA. Estos se dan través de otras enzimas como la quimasa, la catepsina G y la CAGE (*Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme*).

La quimasa es una serinproteasa presente en los mastocitos, y se considera que es la proteasa predominante en la formación de AngII a partir de AngI a nivel cardíaco en seres humanos, que además tiene una potencia catalítica 20 veces mayor que la ECA<sup>77,78</sup>. La quimasa es ubicua, y se la ha relacionado a múltiples patologías humanas en múltiples tejidos<sup>79</sup>. En tejido cardíaco se la ha localizado también en los fibroblastos, y sería esta la fuente más abundante de quimasa a nivel cardíaco en

corazones sometidos a sobrecarga de volumen <sup>79</sup>. La actividad de quimasa aumenta en situaciones patológicas como en la hipoxia <sup>80,81</sup>, estiramiento hemodinámico <sup>82</sup>, e hiperglucemia <sup>83,84</sup>.

A pesar de que la vía de las quimasas parece ser una fuente importante de AngII tisular en múltiples procesos patológicos en seres humanos, el papel que desempeña en roedores, especialmente en ratas, sería muy marginal ya que las dos isoformas de quimasa murina clivan la AngI para formar dos fragmentos inactivos: Ang-(1-4) y Ang-(5-10). Estudios experimentales han demostrado que en ratas, la formación de AngII se puede inhibir por completo con un IECA, mientras que la administración de quimostatina (un bloqueante de quimasas) no produce ningún efecto en la producción de AngII <sup>85</sup>. Otros autores han vinculado la quimasa murina con la formación de AngII a partir de otro sustrato, la Ang-(1-12) <sup>54,86</sup>.

En ratas se ha identificado a la elastasa-2 murina (E2m) como una fuente de AngII independiente de ECA, que es también una serinproteasa sensible a quimostatina <sup>64,87,88</sup>. Parecería estar distribuida en múltiples tejidos, ya que el ARNm de E2m se ha ubicado en tejido pancreático, pulmón, corazón, riñón, hígado, bazo y carótida <sup>64</sup>. Además de formar AngII a partir de AngI, la E2m tiene capacidad para formar AngII directamente a partir del angiotensinógeno <sup>89,90</sup>. Becari y cols. demostraron no solo que la E2m y ECA participan en conjunto de la conversión de AngI a AngII en condiciones fisiológicas <sup>87</sup>, sino que también han observado que el tratamiento de SHR y de ratas normotensas con enalapril aumenta la proporción de AngII generada por E2m. Este mecanismo sensible a quimostatina está marcadamente aumentado en las carótidas y corazón de SHR, donde se vio un aumento significativo en la expresión de ARNm de E2m en las ratas que recibieron enalapril <sup>91</sup>.

#### **1.2.4 Efectos no hemodinámicos de la AngII**

Además de sus funciones hemodinámicas, en las últimas décadas se ha comenzado a caracterizar el rol de la AngII como inductor de cascadas inflamatorias, profibróticas y proliferativas.

Numerosos trabajos han demostrado el efecto de la AngII como activador del factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$  $\beta$ ) a nivel citoplasmático en muchos tejidos, tanto a través de su vía clásica como de la vía no-clásica <sup>92</sup>. Sin embargo, existe controversia respecto del receptor encargado de esta activación. Wolf y cols. demostraron en 2002



que tanto la estimulación de AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> eran capaces de activar NF-κβ en cultivos celulares<sup>93</sup>. Ruiz-Ortega y col también lo habían demostrado en células musculares lisas vasculares, ya que ratones knock-out para AT<sub>1</sub> también tenían una respuesta de activación de NF-κβ inducida por AngII. Luego demostraron que el bloqueo secuencial de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> solo atenuaba parcialmente la activación de NF-κβ<sup>94</sup>. Trabajos previos habían demostrado la capacidad de bloqueantes específicos de AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> para reducir la expresión de NF-κβ en forma diferencial según el tejido, ya que el bloqueo de AT<sub>1</sub> reducía la actividad de NF-κβ en células glomerulares y tubulares, mientras que el bloqueo de AT<sub>2</sub> atenuaba su activación solo a nivel glomerular y en células inflamatorias<sup>95</sup>. Trabajos más recientes han evidenciado en un modelo murino de diabetes tipo 2 inducido por estreptozotocina que la activación de NF-κβ es dependiente de AT<sub>1</sub>, mientras que la activación de AT<sub>2</sub> reprime su activación en tejido renal<sup>96</sup>. Si bien no se ha dilucidado bien el mecanismo por el cual los mismos receptores pueden tener diferentes respuestas activadoras, en todos los casos la exposición a AngII indujo la activación del sistema NF-κβ.

El NF-κβ tiene la propiedad de activar la expresión de cito y quimioquinas, presentación de inmunoreceptores, expresión de moléculas de adhesión celular y de presentación antigénica, e inducción de proteínas de fase aguda en el hígado. Por ello se lo considera uno de los ‘reguladores maestros’ de la inflamación<sup>97</sup>. Estos efectos los logra mediante la interacción con los promotores de genes que regulan el metabolismo, la síntesis proteica y la función de canales iónicos, y genes que expresan citoquinas, factores de crecimiento y de transcripción<sup>98</sup>. Entre ellos, en NF-κβ es capaz de inducir la síntesis de TNF-α e IL-6<sup>99</sup>.

Además de inducir la activación de NF-κβ, la AngII es capaz de potenciar al sistema inmune innato a través de otros sistemas inflamatorios, por ejemplo, aumentando la expresión de receptores tipo Toll 4 (TLR4). En células mesangiales se ha observado que esto, en conjunto con la activación de NF-κβ, resulta en un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6<sup>100</sup>. Efectos similares se han observado en células tubulares, donde la AngII induce un aumento en la expresión de TLR4 quien consecuentemente induce la activación de NF-κβ<sup>101</sup>. La AngII es capaz de inducir la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias como TNFα en fibroblastos cardiacos<sup>102</sup>.

En los últimos años incluso se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido en forma directa y a través de la depleción de los mecanismos antioxidantes puede a su vez aumentar la expresión del receptor AT<sub>1</sub> por un mecanismo mediado por NF-κβ

en células de músculo liso aórtico humano <sup>103</sup>. En células de línea neuronal se han observado fenómenos parecidos <sup>104,105</sup>. Esto se explicaría a través de la existencia de un sitio de unión para NF- $\kappa$ B en el promotor del gen del receptor AT<sub>1</sub> <sup>106</sup>. A su vez, también se ha demostrado un aumento en la expresión de AT<sub>1</sub> en fibroblastos cardíacos en respuesta a la estimulación por TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mecanismo también mediado por NF- $\kappa$ B <sup>107</sup>. Adicionalmente se ha demostrado que la propia AngII puede aumentar la expresión de AT<sub>1</sub> por mecanismos mediados por NF- $\kappa$ B, al menos en neuronas <sup>108</sup>.

Respecto del rol de la AngII como factor profibrótico, se ha demostrado que la AngII induce la producción de colágeno tipo I en células de músculo liso vascular a través de la activación del gen del procolágeno tipo I y tipo III por la vía de la MAPK/ERK. Estos efectos estarían mediados en parte a través del receptor AT<sub>1</sub> <sup>109,110</sup>. A su vez, la AngII potencia la síntesis de TGF- $\beta$  y el depósito de colágeno. Se ha visto además que el bloqueo de TGF- $\beta$ , que fue previamente inducido por AngII, inhibe el aumento en el depósito de colágeno en la matriz extracelular <sup>111</sup>. Otro factor inducido por AngII es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), inducido por las vías del ERK y JNK <sup>112</sup>.

Levy y cols. han demostrado que la señalización a través de AT<sub>2</sub> también participa del efecto hipertrófico en la pared vascular. En un modelo murino de HTA inducido por AngII observaron que el bloqueo crónico de AT<sub>2</sub> no modifica la hipertrofia cardíaca, pero antagoniza el crecimiento del músculo liso vascular e impide la hipertrofia de la capa media. Inversamente, el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> con losartan no impidió el remodelado vascular <sup>113</sup>. Los mecanismos por los que la AngII produce hipertrofia de la pared vascular podrían involucrar a microARNs y otros factores de transcripción regulados por AngII como las MAPK, que serían los responsables de inducir un cambio fenotípico en las células musculares lisas de ‘contráctil’ a ‘proliferativo’ <sup>114</sup>.

A nivel cardíaco se ha demostrado que la AngII tiene efectos en el remodelado cardíaco que son independientes de su efecto presor, y se han demostrado cascadas de señalización que conducen a la hipertrofia cardíaca *in vitro* <sup>115</sup>. Los efectos hipertróficos son mediados por AT<sub>1</sub>, y pueden conducir tanto al remodelado adaptativo (hipertrofia concéntrica del VI) como al maladaptativo (miocardiopatía dilatada) <sup>116</sup>. Las cascadas de señalización relacionadas con estos efectos están mediadas por al menos tres MAPK: p38 kinasas, JNK y ERK 1/2 <sup>117</sup>: ERK 1/2 se ha asociado al remodelado adaptativo con aumento del espesor de los cardiomiocitos <sup>118</sup>, mientras que JNK se ha asociado al remodelado maladaptativo debido a su importante papel

como mediador apoptótico<sup>116,117,119</sup>. Estas vías finalizan en la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, proteína activadora 1 (AP-1) y Smad, que interactúan con TGF- $\beta$  para iniciar la transcripción de genes que conducen al remodelado cardíaco<sup>120-123</sup>.

De estos últimos, el NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción sensible a los cambios del estado de óxido-reducción celular, y se ha vinculado el aumento de las ERO con la activación de factores como NF- $\kappa$ B y el AP-1, así como con la promoción de la activación de MMP<sup>124-126</sup>. Por ello se postula que el remodelado hipertrófico mediado por AngII depende del aumento de ERO en condiciones patológicas<sup>123,127-129</sup>, lo que estaría mediado por diferentes isoformas de la NADPH oxidasa (Nox)<sup>128,130</sup>. La Nox-2 parecería cumplir un papel importante en la señalización a través de ERK 1/2, NF- $\kappa$ B y otros factores de transcripción que conducen a hipertrofia mediada por AngII<sup>131,132</sup>. A su vez, la activación de MMP mediada por AngII estaría influenciada también por el aumento de las ERO<sup>133,134</sup>. Finalmente, otro mediador que ha demostrado ser importante en la hipertrofia cardíaca es el TNF- $\alpha$ , que además de ser activado por la AngII<sup>135,136</sup>, comparte vías de señalización con esta que determinan remodelado hipertrófico cardíaco. De hecho, en modelos murinos *knock out* para TNF- $\alpha$  se demostró que es imprescindible para promover la hipertrofia mediada por AngII<sup>123,137</sup>.

Respecto de los efectos profibróticos de la AngII, el paso necesario para iniciar este proceso es la diferenciación de los fibroblastos cardíacos en células miofibroblásticas, que se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso y aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular. Esta diferenciación, además de su estimulación por AngII, también requiere de la activación de TGF- $\beta$ . Este último a su vez aumenta la expresión de AT1<sup>138</sup>, receptor que a través de la unión con AngII también funciona como activador de la transcripción de TGF- $\beta$ <sup>139</sup>, creando mecanismos de retroalimentación positiva. La inducción de TGF- $\beta$  también aparenta ser un fenómeno dependiente del aumento de ERO<sup>121,129,139</sup>, en la cual uno de los protagonistas sería la Nox-4<sup>140</sup>. Las vías de señalización del TGF- $\beta$  que promueven la fibrosis miocárdica serían algunas de las ya implicadas en el proceso de hipertrofia: p38 MAPK y AP-1<sup>121,139</sup>. En estos casos la AngII no solo estimula la síntesis de endogлина en fibroblastos cardíacos a través de AT<sub>1</sub>, favoreciendo el depósito de colágeno<sup>141</sup>, sino que además posee efectos aditivos con TGF- $\beta$ , quien también estimula la síntesis de colágeno por una vía dependiente de serpinaE2/proteasa nexina-1<sup>142</sup>.

El proceso de fibrosis miocárdica no es solamente función del depósito de colágeno en la matriz, sino del balance entre depósito y degradación a cargo de las MMP. El efecto neto está dado por el equilibrio entre las MMP y el inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP) <sup>116,138,143</sup>. Estas proteínas también han demostrado estar bajo la influencia de la AngII, a través de AP-1 y NF- $\kappa$ B, que pueden aumentar la expresión de uno o ambos componentes <sup>127,144</sup>. Estos a su vez están influenciados por la actividad de TGF- $\beta$  y el estado de óxido-reducción celular <sup>138,145,146</sup>.

Además de sus efectos directos sobre el remodelado cardíaco a través de AT<sub>1</sub> encontrado en cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos, la AngII participa de la fibrosis cardíaca en forma indirecta. Estos efectos indirectos son mediados por los mineralocorticoides, principalmente la aldosterona, a través de un mecanismo dependiente de calcio <sup>147</sup>. Según trabajos publicados, los receptores de mineralocorticoides contribuyen a la activación de NADPH oxidasa que son dependientes de AngII, ya que su activación y la fibrosis miocárdica pueden ser inhibidas *in vivo* mediante la administración de bloqueantes de los receptores <sup>148</sup>.

A nivel renal se han hecho observaciones similares. Los fibroblastos del intersticio renal poseen AT<sub>1</sub>, y la AngII es capaz de inducir eventos proliferativos tales como síntesis de TGF- $\beta$  (factor que favorece el depósito e inhibe la degradación de proteínas de la matriz extracelular), hiperplasia y acumulación de matriz extracelular. Esto lo lograría a través de vías dependientes de la movilización de calcio, PKC y tirosinas-kinasas. También se ha observado que la AngII induce hiperplasia e hipertrofia en células mesangiales, e hipertrofia sin hiperplasia en las células tubulares renales <sup>149</sup>.

En fibroblastos de diferentes líneas se ha evidenciado además la expresión de ARNm de angiotensinógeno y marcación positiva para ECA, AngI y AngII, por lo que estas células podrían presentar un SRA intracelular propio <sup>149</sup>.

### 1.2.5 SRA tisular

El conocimiento del SRA ha avanzado notablemente en los últimos años desde un sistema endocrino lineal a un concepto nuevo que agrega a la visión clásica una serie de SRA locales y tisulares. Esto se debe a que en un mismo tejido se expresan y son funcionales todos los componentes del SRA. Esto expande la visión del SRA como un sistema únicamente sistémico limitado a la circulación, dando lugar a un sistema

tisular global con efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos que contribuyen a la función local de cada tejido <sup>23,150-153</sup>.

El SRA es uno de los blancos terapéuticos más apuntados para el tratamiento de la HTA dada la hiperactivación de la vía clásica que se observa en esta patología <sup>36,154,155</sup>. Todos los péptidos precursores y enzimas del SRA, así como sus receptores, han sido localizados en varios tejidos tales como el corazón, la pared arterial, las glándulas adrenales, el riñón, las gónadas y el cerebro, entre otros <sup>152,156,157</sup>. Estos hallazgos amplían el potencial para el universo terapéutico de las enfermedades cardiovasculares y renales mediante la manipulación farmacológica del SRA.

### **SRA tisular cardíaco**

La síntesis de varios componentes del SRA en el corazón <sup>158</sup> o su captación desde el plasma <sup>159</sup> hace posible la síntesis local de AngII. Estudios previos realizados en cerdos sanos indicaron que hasta un 75% de la AngII cardíaca es de síntesis local <sup>160</sup>, de hecho, Danser y Deinum sostienen que la mayor parte de la AngI y la AngII se sintetizan localmente porque la renina circulante de origen renal es captada desde la circulación por el tejido cardíaco <sup>28</sup>. No sólo hay síntesis local de AngII en el corazón a partir de renina local o circulante, sino que el complejo AngII-AT<sub>1</sub>, formado por la unión de la AngII circulante a su receptor, es internalizado, contribuyendo a los niveles intracardíacos de AngII y otras Angiotensinas derivadas de la misma <sup>153</sup>. En humanos el curso clínico de la insuficiencia cardíaca se asocia con un aumento progresivo de la formación local de AngII <sup>161</sup>.

Estudios en ratones transgénicos mostraron que cuando las condiciones de carga hemodinámicas no se modifican, la AngII de origen cardíaco no altera el tamaño ni la función del corazón <sup>162</sup>. Sin embargo, en animales hipertensos, la AngII cardíaca promueve la inflamación, el estrés oxidativo y la muerte celular contribuyendo a la hipertrofia y fibrosis cardíacas <sup>163</sup>.

### **SRA tisular renal**

Todos los componentes del SRA, incluyendo a AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, son localmente expresados y sintetizados en el riñón, y se encuentran tanto en el riñón fetal como en el adulto <sup>156,164,165</sup>.

El contenido de AngII en el riñón es significativamente mayor que en otros tejidos y el plasma <sup>166</sup> y, si bien la AngII puede ser directamente captada desde la

circulación, se ha demostrado que la formación de este péptido ocurre también en forma local por acción de la ECA presente en las células del ribete en cepillo del túbulo proximal sobre la AngI. Además, la AngII puede auto-amplificar su producción, estimulando la transcripción y síntesis proteica de angiotensinógeno renal.

Se han observado niveles aumentados de angiotensinógeno intrarrenal en modelos experimentales de enfermedad renal, apoyando el concepto de que el SRA local desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad renal <sup>167</sup>. También se demostró que el SRA renal está activado en la insuficiencia cardíaca y que la producción local de AngII influencia directamente al equilibrio hemodinámico a través de la reabsorción tubular de sodio, promoviendo la retención de fluidos y el aumento de la PA <sup>168</sup>.

### 1.2.6 Desarrollo renal y SRA

El SRA es un importante regulador de la PA y del balance hidrosalino. Numerosos estudios indican que el SRA juega un papel importante en la etiología de la hipertensión arterial programada por agresiones *in utero*, dado que es crucial en el crecimiento, desarrollo y función de muchos órganos incluyendo el riñón, el corazón y la placenta <sup>169</sup>.

En la nefrogénesis murina normal, todos los componentes del SRA comienzan a expresarse en forma intensa aproximadamente a partir del día 12 de vida embrionaria <sup>38,170</sup>. En un principio, la expresión de AT<sub>2</sub> es mucho mayor que la de AT<sub>1</sub>. La expresión de ambos continúa aumentando hasta el día 20 de la vida embrionaria cuando se iguala la abundancia de ambos <sup>170</sup>. Luego del nacimiento, el riñón murino continúa su desarrollo, aproximadamente por dos semanas más, período que se ha equiparado con el tercer trimestre en humanos <sup>171,172</sup>. A partir del nacimiento el receptor AT<sub>2</sub> comienza disminuir su densidad hasta volverse prácticamente indetectable en el riñón adulto <sup>170,173</sup>. En cambio, la densidad de AT<sub>1</sub> continúa aumentando hasta llegar a un pico aproximadamente el día 7 de vida <sup>170,174</sup>. Además de tener un patrón de expresión temporal diferente, ambos receptores se localizan con mayor densidad en tejidos diferentes: AT<sub>2</sub> se expresa principalmente en el tejido mesenquimático poco diferenciado, mientras que AT<sub>1</sub> se expresa preferencialmente en estructuras vasculares, glomérulos y segmentos tubulares más maduros, como túbulos colectores y asa gruesa de Henle <sup>170,173-175</sup>. La Ang II, al interactuar con AT<sub>1</sub>, media el crecimiento y la proliferación de los túbulos renales durante la organogénesis renal <sup>176</sup>.

Por el contrario, AT<sub>2</sub> tiene acciones antiproliferativas, y actúa mediando procesos apoptóticos <sup>177</sup>.

Estudios previos han demostrado el papel crítico del SRA como mediador de la nefrogénesis. El bloqueo de AT<sub>1</sub> durante el período nefrogénico posterior al nacimiento induce una disminución del número de glomérulos en la corteza renal, asociado a signos de hipertrofia y acortamiento de las arterias pre-glomerulares. En la médula renal se observan signos de hidronefrosis, así como atrofia y agenesia de la médula interna, que se asocia a una reducción en el crecimiento y desarrollo de la vasculatura post-glomerular, en particular de los *vasa recta*. Todo ello condiciona una reducción de la función renal, un defecto en la capacidad de concentración de orina, y un aumento de la PA <sup>171,175,178-181</sup> <sup>177</sup>. El bloqueo de AT<sub>2</sub> en cambio no ha demostrado cambios significativos en la nefrogénesis murina <sup>182,183</sup>.

Numerosos investigadores han examinado el papel de SRA en la etiología de la disminución del número de glomérulos y la HTA en modelos de programación fetal <sup>184,185</sup>. Diferentes modelos de programación fetal, como dietas maternas con bajo contenido de proteínas, exposición a glucocorticoides e hiperglucemia intrauterina muestran alteraciones de la actividad del SRA, HTA y disfunción renal en el animal adulto <sup>186-188</sup>.

La reducción del número de nefrones que ocurre por restricción proteica gestacional está asociada con una reducción marcada del ARNm de la renina y en los niveles tisulares de AngII en las crías al nacimiento <sup>189</sup>. La reducción de la actividad y expresión del SRA tisular y sistémico también fue observada en otros modelos de programación fetal <sup>184</sup>. Estudios recientes en riñones de fetos humanos que tuvieron RCIU mostraron una disminución en la expresión de renina y angiotensinógeno, y un aumento de la apoptosis renal <sup>190</sup>.

### **1.3 Programación fetal de enfermedades cardiovasculares y renales**

En 1988 David Barker publicó estudios realizados en una muestra de la población británica, donde estableció una asociación entre la mortalidad por ECV y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). Descubrió que existía una relación inversa entre el peso al nacer y la PA en la vida adulta, por lo que postuló que la HTA es el nexo entre un ambiente intrauterino adverso y el riesgo de mortalidad por ECV en la vida adulta <sup>191</sup>. A partir de estos estudios se comenzó a elaborar la hipótesis de

programación fetal. Sostiene que una injuria nutricional intra útero, además de causar RCIU y bajo peso al nacer (BPN), pondría en marcha respuestas adaptativas que podrían traer ventajas inmediatas, al aumentar la supervivencia perinatal después de atravesar un ambiente intrauterino adverso, pero que programarían en el individuo una menor capacidad funcional para su vida posterior. Esto en el largo plazo podría predisponer al desarrollo de enfermedades endócrinas, metabólicas, cardiovasculares y renales en la vida adulta. Se propone además que estas respuestas adaptativas podrían ser perjudiciales para aquellos individuos que en la vida postnatal se enfrentan con ambientes nutricionalmente ricos <sup>192,193</sup>. Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que las enfermedades cardiovasculares y renales pueden ser programadas durante la vida intrauterina <sup>194-199</sup>.

Diferentes modelos en ratas, ovejas, conejos y cerdos han sido descritos para inducir un ambiente fetal adverso y semejar las condiciones de RCIU en humanos. Dentro de los mismos se encuentran la restricción dietaria global <sup>200</sup>, la restricción proteica durante el embarazo <sup>189,201,202</sup>, la hipoxia crónica generada en la madre durante el periodo gestacional <sup>203</sup>, la insuficiencia placentaria <sup>204,205</sup>, el tratamiento prenatal con glucocorticoides <sup>206-208</sup>, la deficiencia de hierro <sup>209,210</sup> y la alta ingesta de grasas <sup>211,212</sup>, entre otros.

La desnutrición global y la restricción proteica durante el periodo gestacional en ratas y ovejas resultan en crías con BPN que posteriormente desarrollan un marcado aumento de la PA en la adultez <sup>202,213,214</sup>. Más aún, la magnitud de los cambios observados en la PA mostró depender del grado de restricción proteica inducido durante la gestación <sup>215,216</sup>. En modelos de programación fetal inducidos por una disminución de la perfusión placentaria en ratas a partir del día 14 de gestación también se observó que las crías macho y hembra presentaban una reducción del 12% en el peso al nacer y un aumento de la PA media a las 4 semanas de edad <sup>215,217</sup>.

Los mecanismos que conducen a la programación de estos eventos parecen ser multifactoriales y dependientes del tipo de desnutrición y de las adaptaciones fetales desarrolladas durante periodos críticos de la organogénesis. Estas adaptaciones determinarían la capacidad funcional de los sistemas cardiovasculares y renales. Dentro de estos mecanismos se podría enumerar cambios epigenéticos en la regulación de genes, variaciones en la estructura de órganos, procesos de remodelación apoptótica y alteraciones metabólicas <sup>193,218,219</sup>



Brenner y cols fueron los primeros en postular que una reducción en el área de filtración renal, resultado de una disminución en el número de glomérulos y/o del área de filtración por glomérulo, constituye una anomalía morfológica renal fundamental para el inicio de la HTAe <sup>193,220,221</sup>. Más aún, estudios realizados en humanos y en modelos animales de programación fetal demostraron que el BPN es un factor de riesgo para el desarrollo de un menor número y volumen glomerular <sup>193,222</sup>.

Se propone que en respuesta a la reducción en el número de nefronas se produce una hipertrofia compensadora de los glomérulos remanentes que conduciría a un aumento en la TFG de cada nefrona. A pesar de esta respuesta adaptativa compensatoria, se observa igualmente una reducción en la superficie filtrante renal que conduce a la retención de sodio, la disminución de la TFG global, y el subsiguiente aumento de la volemia y la PA. La HTA sistémica luego originaría hipertensión y esclerosis glomerular, y proteinuria, lo cual perpetúa el aumento de la PA y conduce a una progresiva pérdida glomerular <sup>223,224</sup>.

Trabajos experimentales han propuesto un gran número de mecanismos que conducen a la disminución del número de glomérulos y a un estado hipertensivo <sup>223</sup>. Estudios realizados en modelos animales de programación fetal inducidos por restricción proteica gestacional e insuficiencia placentaria mostraron que la reducción de nefrones se asoció a la disminución en la expresión de factores antiapoptóticos (Bcl2, Pax-2) y a un aumento de los proapoptóticos (p53 Bax, caspasa 3) en el riñón <sup>223,225,226</sup>.

Cambios epigenéticos en el ADN, inducidos por la metilación de nucleótidos de citosina en secuencias citosina-guanina (CpG), representarían uno de los mecanismos a través de los cuales un ambiente intrauterino inadecuado altera la regulación de la apoptosis durante el desarrollo de órganos clave como el riñón. Determinados nutrientes que son cofactores y dadores de grupos metilos, como la colina, la niacina, el ácido fólico, la vitamina B12, la vitamina C, la metionina, el glutatión (GSH), el zinc y el selenio, regulan epigenéticamente la expresión genética. Las deficiencias de estos micronutrientes durante el desarrollo temprano pueden resultar entonces en anomalías estructurales y bioquímicas que persisten hasta la adultez <sup>223,227,228</sup>.

Dada la importancia del papel del SRA en la organogénesis renal, la supresión del mismo durante el desarrollo podría tener un papel clave en los cambios estructurales y fisiológicos renales observados en los modelos de programación fetal.

<sup>178</sup>. La disminución en el número de glomérulos y el aumento de la PA observado en las crías nacidas de ratas expuestas a una restricción proteica durante la gestación se asoció a una disminución del ARNm de renina y de AngII renal <sup>189</sup>. Una activación inapropiada del SRA renal luego del periodo nefrogénico parece estar también asociado con el establecimiento de la HTA en la vida adulta <sup>223</sup>.

La activación del sistema nervioso simpático podría también contribuir a la HTA asociada con el BPN, dado que se han observado niveles elevados de norepinefrina en modelos animales de programación fetal por restricción proteica gestacional, insuficiencia placentaria e hipoxia prenatal <sup>229,230</sup>.

Estudios clínicos y en modelos animales de programación fetal mostraron que el BPN y la HTA en la vida adulta se encuentran también asociados con alteraciones de la función endotelial ligados a las alteraciones del sistema del NO y al aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Brawley L y cols mostraron que las crías de rata expuestas a restricción proteica durante la vida intrauterina presentan una alteración en la relajación vascular dependiente e independiente del NO endotelial <sup>231,232</sup>. Franco y cols a su vez demostraron que las crías nacidas de madres desnutridas presentaban una menor expresión de la enzima eNOS, y una menor actividad de la NOS en la aorta <sup>231,232</sup>. La menor actividad del sistema del NO en los vasos sanguíneos se debería a un aumento de las ERO, que disminuye la biodisponibilidad del NO. En el modelo de desnutrición intrauterina global, se observó una disminución en la actividad de la SOD, un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa y un aumento en las concentraciones del anión superóxido <sup>231</sup>. En este modelo el tratamiento de las crías con vitamina C y E (agentes que actuarían como reductores del estrés oxidativo) atenuó tanto a la HTA como a la disfunción endotelial <sup>233</sup>. Estos trabajos demuestran que un ambiente intrauterino adverso puede resultar en una menor biodisponibilidad de NO y en un aumento del estrés oxidativo, los cuales pueden contribuir a la disfunción endotelial y a la programación fetal de la hipertensión en la vida adulta.

### **1.3.1 Diferencias de sexo en modelos de programación fetal de ECV**

Las diferencias entre sexos observadas en modelos de programación fetal mediante una injuria durante el desarrollo están determinadas principalmente por diferencias en los patrones del desarrollo (genéticos, transcripcionales y morfológicos), el momento de la injuria, y por la influencia de la exposición a hormonas esteroideas durante la vida fetal y postnatal <sup>234</sup>. Las hembras presentan

menor riesgo de enfermedad cardiovascular que los machos debido principalmente a la protección estrogénica, diferencia que desaparece luego de la menopausia y en modelos experimentales de ovariectomía en etapas temprana de la vida<sup>235,236</sup>. Diversos estudios demostraron la susceptibilidad masculina a la injuria renal<sup>237,238</sup>, y otros la susceptibilidad femenina a las alteraciones placentarias<sup>239,240</sup>.

En muchos modelos de programación fetal en ratas de ambos sexos se evidenció mayor susceptibilidad al desarrollo de HTA en los machos<sup>186,215,237,241</sup>. Ojeda y cols. demostraron que la RCIU en ratas macho programa HTA que se asocia a una sensibilidad aumentada a la exposición aguda con AngII, ambos fenómenos dependientes de testosterona<sup>236,242</sup>. En el mismo modelo, demostraron que las hembras normotensas después de la pubertad podían desarrollar HTA si eran privadas de estradiol: en esta situación también evidenciaban una sensibilidad aumentada a la exposición aguda con AngII<sup>215,235,243</sup>. En un modelo de estrés neonatal Loria y cols. demostraron que la aparición de HTA mediante una infusión crónica de AngII era dependiente de testosterona en los machos, mientras que en las hembras la aparición de HTA estaba atenuada<sup>244</sup>. Esta dependencia de la respuesta presora con los esteroides sexuales también se ha evidenciado en modelos de injuria fetal por exposición a nicotina<sup>245</sup>. Estos trabajos indican que los esteroides sexuales juegan también un papel central en el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular programada por insuficiencia placentaria.

Sin embargo, no queda claro que el papel de los esteroides sexuales sea el mismo en todos los modelos de injuria fetal. En la restricción proteica materna moderada se observó la programación de HTA en las crías macho, pero fue un evento independiente de la testosterona circulante. En las crías hembra se observó que la programación de HTA requería una restricción proteica severa, aunque no se evaluó el papel del estradiol en ese modelo<sup>246</sup>.

Otros trabajos en cambio observaron que la injuria prenatal afectó principalmente a las crías hembra. En un modelo de programación fetal con dieta rica en grasas se observó un aumento de la PA solo en las hembras<sup>212</sup>. La exposición a etanol durante el desarrollo fetal produce hipertrofia ventricular sólo en las crías hembras<sup>247</sup>. Por lo tanto, las diferencias de sexo observadas en la programación fetal estarían determinadas no solo por el tipo de injuria, sino también por la duración y el periodo de vida en el que se sufre la misma, así como la edad en la cual se evalúan las alteraciones.

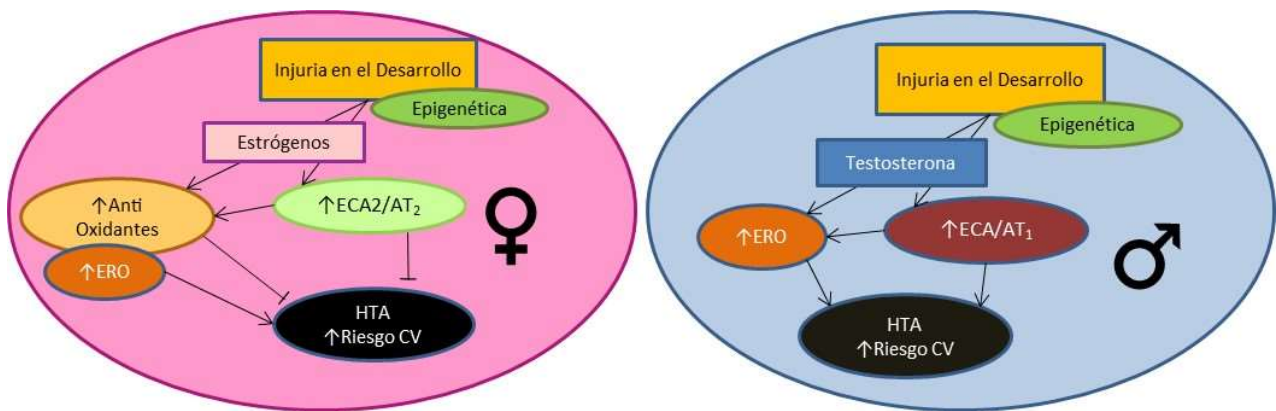
No están claros los mecanismos por los cuales se desarrolla esta susceptibilidad diferencial dependiente del sexo ante la exposición a diferentes agresiones durante la vida prenatal y postnatal temprana. Estudios en ratones demostraron que las placentas de las crías hembra se adaptan mejor que la de los machos ante diversas injurias prenatales <sup>239,240,247</sup>. Esto permitiría amortiguar los efectos de un ambiente intrauterino adverso, manteniendo los fetos hembra en mejores condiciones. En términos energéticos la biología evolutiva postula que los mamíferos masculinos son “más costosos” que las hembras para la madre gestante. Por ello, la energía invertida en adaptaciones tisulares ante diversos estresores estaría invertida preferencialmente en la descendencia femenina, ya que su fisiología general y reproductiva debe ser preservada para asegurar la reproducción y lactancia <sup>248,249</sup>. Estos mecanismos adaptativos se observan en modelos de programación fetal donde, en una misma camada, el desarrollo somático de las crías macho no es priorizado respecto al de las crías hembras <sup>213,215,238,241,246</sup>.

En resumen, varios modelos de programación (tanto por injuria fetal como por injuria en etapas tempranas de la vida) han establecido importantes diferencias entre sexos en la PA, tanto en estado basal como en la respuesta presora ante la exposición aguda y crónica a AngII. Muchos de estos modelos sugieren que la testosterona posee una influencia prohipertensiva, mientras que los estrógenos contribuyen a tener un efecto antihipertensivo. Este efecto no se observó en forma uniforme en todos los modelos estudiados, lo que sugiere que la interacción entre los diferentes sistemas es más compleja e involucraría a otros actores <sup>250</sup>.

Los esteroides sexuales estarían ejerciendo estos efectos mediante la expresión diferencial de los elementos de las dos vías del SRA. La insuficiencia placentaria genera un aumento marcado de la ECA renal en crías macho hipertensas, mientras que las hembras con RCIU no desarrollan HTA en la adultez evidencian un aumento en la expresión renal de ECA2 <sup>251</sup>. La ovariectomía no solo reduce la expresión renal de ECA2, permite la aparición de HTA, suprimible mediante la administración de un IECA <sup>235</sup>. Modelos similares de insuficiencia placentaria programan un aumento en la expresión de AT<sub>1</sub> en crías macho con HTA, sin cambios en las crías hembra normotensas <sup>252</sup>. En un modelo de restricción proteica moderada durante la gestación se observó un aumento en la expresión de AT<sub>2</sub> en crías hembra, sin cambios en las crías macho <sup>253,254</sup>. En ratas macho se ha evidenciado que la expresión preferencial de la vía clásica del SRA es dependiente de testosterona <sup>255</sup>. En las hembras se ha observado que el estrógeno favorece la expresión de la vía no-clásica mediante un aumento en la producción de Ang-(1-7), y aumenta la expresión renal de AT<sub>2</sub> y ECA2

en ratas hembra en respuesta a la exposición crónica a AngII <sup>256</sup>. Además, las ratas macho exhiben mayor densidad del receptor AT<sub>1</sub> en tejido renal en comparación con las hembras, mientras que las hembras exhiben mayor expresión renal de AT<sub>2</sub> <sup>257,258</sup>.

Estos trabajos sugieren que la HTA programada por injuria gestacional podría deberse a un aumento en la expresión de los componentes de la vía clásica (vasoconstrictora) del SRA, mientras que la aparente protección conferida a las crías hembra podría deberse a una mayor expresión de la vía no-clásica (vasodilatadora) (Figura 4). Adicionalmente, indican que la injuria en etapas tempranas del desarrollo programa alteraciones sexo-específicas en la expresión del SRA, de las que dependerá la aparición posterior del fenotipo hipertensivo. En las crías hembra estas alteraciones además son dependientes de la edad.



**Figura 4:** Diferencias de sexo en la expresión del SRA en modelos de injuria en etapas tempranas de la vida. Modificado de Intapady cols, 2014.

Diferencias similares dependientes del sexo, probablemente mediadas por esteroides sexuales, se han observado en relación al estrés oxidativo. La insuficiencia placentaria se asocia al del estrés oxidativo en crías hipertensas macho, pero no en las crías normotensas hembra. El tratamiento con tempol (mimético de la SOD) logra abolir la HTA en los machos, indicando que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la HTA programado por RCIU. Las crías con RCIU hembra, normotensas, evidencian en cambio un aumento en la expresión de catalasa, indicando que la programación adversa de HTA por injuria gestacional podría estar contrarrestada por un aumento en la expresión de sistemas antioxidantes <sup>259</sup>. El tempol también suprime la HTA inducida por restricción proteica gestacional <sup>260</sup>. En el modelo de injuria fetal con nicotina, la ovariectomía aumenta la reactividad vascular a la administración de AngII, así como aumenta la producción de ERO en segmentos

de aorta. El antioxidante apocynina logra abolir este aumento en la reactividad vascular, lo que evidencia el efecto de los esteroides sexuales en la atenuación de los efectos de la programación fetal de ECV <sup>261</sup>.

Unos pocos estudios han sugerido que diversos procesos epigenéticos podrían estar involucrados en la programación de ECV por injuria fetal <sup>262</sup>, algunos a través de la modificación en la expresión del SRA, modificaciones que en algunos casos dependen del sexo. Se ha observado que la restricción proteica gestacional altera los patrones de metilación de la ECA en el cerebro fetal <sup>263</sup>, y de AT<sub>1b</sub> en la glándula suprarrenal a las 4 semanas de edad <sup>264</sup>. A su vez, la insuficiencia uteroplacentaria en la rata programa diferencias sexo-específicas en el patrón de metilación de la enzima 11- $\beta$ -OH-esteroide-deshidrogenasa tipo 2 a los 20 días de vida, una enzima involucrada en la sensibilidad renal a los glucocorticoides <sup>265</sup>. Si estas diferencias persisten en la vida postnatal o contribuyen al desarrollo de HTA no ha sido dilucidado. Sin embargo, diferencias sexo-específicas en los procesos de metilación podrían contribuir a las diferencias entre sexos de la enfermedad cardiovascular programada.

## **1.4 Zinc, un micronutriente esencial**

### **1.4.1 Deficiencia de Zinc**

La desnutrición oculta se define como el conjunto de carencias específicas de micronutrientes esenciales, que se caracterizan por ser altamente prevalentes y de importancia en la salud. Según la OMS y UNICEF es un problema que afecta principalmente a niños y mujeres embarazadas, ya que son momentos en la vida con altos requerimientos de micronutrientes para lograr un óptimo desarrollo. Entre los micronutrientes más prevalentes con esta deficiencia se enumeran el zinc, el hierro, la vitamina A, vitaminas del grupo B, folatos, y/o ácidos grasos esenciales. Es un tipo de desnutrición que puede encontrarse en individuos sin distinción de su condición socioeconómica, incluso en personas con normo y sobrepeso <sup>266</sup>. En Argentina, así como en el resto de Latinoamérica, la desnutrición oculta es un problema frecuente <sup>267,268</sup>. Muchos niños ingieren un contenido calórico adecuado o incluso excesivo, pero la desnutrición oculta condiciona una menor tasa de desarrollo: uno de sus indicios es su baja estatura a pesar de mostrar signos de sobrepeso <sup>269</sup>.

La desnutrición oculta materna determina además una restricción para el correcto crecimiento y desarrollo fetal lo que aumenta la morbimortalidad neonatal. Esto, combinado con una lactancia subóptima, condiciona el desarrollo físico en la vida postnatal hasta los 2 años de vida <sup>270</sup>.

Estudios experimentales y en humanos mostraron que las deficiencias tempranas de zinc afectan numerosos tejidos <sup>227,271</sup>, sin embargo, muy pocos trabajos muestran sus efectos en la programación de patología en el adulto. <sup>272,273</sup>.

Según la OMS, la ingesta inadecuada de zinc estaría entre los primeros 5 factores de riesgo más importantes para la salud en países subdesarrollados, y entre los primeros 11 factores de riesgo a nivel mundial <sup>274</sup>. Estudios más recientes estiman que el 17% de la población mundial presenta una ingesta deficitaria de zinc <sup>275</sup>. En la Argentina, la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud realizada por la Dirección Nacional de Salud Materno Infantil del Ministerio de Salud de la Nación, realizada en el año 2005, reveló que el 52% de las embarazadas, el 33% de las mujeres en edad fértil y el 16% de los niños entre 6 meses y 5 años presentan una ingesta deficitaria de zinc <sup>276,277</sup>. Estos casos en su mayoría se deben a deficiencias moderadas, ya que la deficiencia severa es un evento esporádico. Los grupos de mayor riesgo para ingesta deficiente de zinc son, independientemente de su condición socioeconómica, los niños, las mujeres durante el embarazo y lactancia, y los ancianos <sup>278</sup>. Un factor a tener en cuenta, es que estos datos no son exactos debido a la complejidad del estudio y hasta el momento no contamos con datos nuevos a cerca de la deficiencia de zinc en la población de nuestro país.

Esta malnutrición del zinc se da habitualmente en el contexto una ingesta inadecuada asociada a un incremento de las necesidades metabólicas del micronutriente, que dependen de la situación fisiológica del individuo. A eso se pueden sumar además problemas relacionados a un aumento en su excreción (diabetes mellitus, diarreas prolongadas, uso de diuréticos), algunas enfermedades genéticas, y trastornos de la absorción intestinal <sup>279</sup>.

#### **1.4.2 Metabolismo del Zinc**

El zinc es un micronutriente esencial, y el contenido corporal de zinc oscila entre los 2 y 4g en seres humanos sanos. Su distribución principal es en depósitos tisulares, principalmente en músculo esquelético (60%), hueso (30%), hígado (5%) y la piel (5%). El resto se encuentra ampliamente distribuido en otros tejidos. El zinc sérico representa solamente el 0,1% del zinc corporal total, el cual se encuentra unido

a proteínas: 80% con albumina, el 20% restante con  $\alpha$ 2-macroglobulinas. En el compartimento intracelular, el 50% se distribuye en el citoplasma, el 30 a 40% en el núcleo celular y un 10% en la membrana plasmática <sup>280</sup>.

Aproximadamente se intercambia el 0,1% del zinc corporal diariamente. La recuperación del zinc excretado se puede hacer solamente a través de la dieta, ya que las únicas fuentes de zinc son exógenas. Este elemento no se encuentra como ion libre en el agua o en los alimentos, por lo que su asimilación es función de la digestión y absorción. Durante la digestión el zinc se une a diferentes componentes en la luz intestinal como péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos y ácidos orgánicos e inorgánicos, lo que facilita su absorción <sup>281</sup>.

Los alimentos constituyen la fuente principal de zinc, entre ellos los de origen animal como carnes, mariscos y pescados. Estos además tienen una alta biodisponibilidad ya que durante la digestión se liberan aminoácidos como lisina e histidina que forman complejos hidrosolubles de zinc, lo que facilita su absorción intestinal. Los cereales, legumbres y verduras también son alimentos muy ricos en zinc, pero durante la digestión liberan altas concentraciones de fitatos y fibra alimentaria que inhiben la absorción del micronutriente ya que forman complejos insolubles con cationes divalentes como el calcio <sup>282</sup>. Cabe destacar que para los lactantes, la biodisponibilidad del zinc es mayor en la leche materna que en la leche de vaca o en las fórmulas para lactantes <sup>283</sup>.

La absorción intestinal de zinc ocurre principalmente en el yeyuno, a través de un proceso transcelular mediado por transportadores <sup>284</sup>. El calcio, hierro, cobre y oxalatos constituyen inhibidores competitivos de la absorción intestinal de zinc ya que se transloca a través de la membrana mediante la participación de transportadores de cationes divalentes (DCT1), que median no solo el ingreso de zinc sino también el de hierro y cobre a las células epiteliales del duodeno y yeyuno. Estos transportadores también se han descrito en epitelio renal y médula ósea. La cinética de absorción parece ser saturable y su velocidad se encuentra aumentada durante la depleción de zinc. Diferentes sustancias químicas tales como los fosfatos y el ácido etilen-di-amino-tetra-acético (EDTA), que se añaden a muchos alimentos procesados, pueden reducir también su absorción <sup>281,283</sup>. Desde allí pasa a la circulación portal, donde unido principalmente a albumina, pasa al hígado donde se constituye la reserva móvil de zinc. La distribución a los tejidos extra hepáticos se produce a través del plasma, donde se encuentra la reserva de intercambio más rápido (hasta el 20% del zinc corporal).



Allí el 80% se encuentra débilmente unido a albumina, el 25% firmemente unido a  $\alpha$ 2-macroglobulinas y el 5% a aminoácidos como cisteína e histidina <sup>280</sup>.

La excreción principal de zinc es a través de las heces, donde se conjugan las pérdidas por descamación del epitelio intestinal con el excretado a través de secreciones pancreáticas, biliares e intestinales. Otras fracciones se excretan a través de la orina, por descamación cutánea, pelo, sudor, semen y menstruación <sup>281</sup>.

Para lograr la homeostasis celular del zinc el organismo se vale de un adecuado transporte y almacenamiento de zinc. Se han descrito diferentes proteínas transportadoras del zinc, entre ellas diez son del grupo ZnT (*zinc transporters*) y catorce del sistema ZIP (*Zrt-, Irt-related proteins*). Su expresión es específica para cada tejido, y función de la sensibilidad heterogénea a la deficiencia o exceso de zinc, así también como a la acción de citoquinas y hormonas <sup>280</sup>. La concentración de zinc iónico lábil en el citoplasma es baja, y su almacenamiento incluye los zincosomas (vesículas citoplasmáticas donde se acumula zinc) y diferentes organelas y proteínas entre las que se han descrito las metalotioneinas <sup>285</sup>. Las metalotioneinas son proteínas ricas en cisteína, que tienen una gran capacidad para unir metales pesados, promoviendo su detoxificación. Estas son ricas en residuos de cisteína, y mediante la oxidación o reducción de sus grupos sulfhidrido pueden secuestrar o liberar el metal, controlando la concentración del zinc libre biodisponible. A su vez, la expresión genética de la metalotioneinas se encuentra también regulada por las concentraciones de zinc. Esto ayuda a las células a protegerse ante aumentos en el estrés oxidativo y de procesos apoptóticos <sup>286-288</sup>.

Las proteínas “dedos de zinc” y ciertas enzimas presentan una unión fuerte con el zinc y muestran ser sensibles a los cambios de las concentraciones celulares de zinc libre. Por lo tanto, un aumento localizado del pool de zinc libre o lábil dentro de la célula, con respecto a las concentraciones de zinc total, puede tener una influencia desproporcionada sobre la activación de proteínas dependientes de zinc. Además, el aumento de especies reactivas puede estimular la liberación de zinc de los complejos que éste forma con las proteínas. Es por ello que es probable que pequeñas alteraciones en la homeostasis del zinc resulten en grandes variaciones del zinc lábil celular y puedan inducir profundos cambios en las vías de señalización intracelulares y en la actividad de diferentes factores de transcripción. Consecuentemente, estas alteraciones podrían mediar el inicio y/o el progreso de enfermedades crónicas, como las cardiovasculares y renales <sup>289</sup>.

### 1.4.3 Requerimientos Dietarios y Evaluación del Estado Nutricional del Zinc

Los requerimientos diarios varían con la edad, el sexo, y la condición fisiológica. En humanos se recomienda una ingesta diaria de 2mg/día hasta los 6 meses, 3mg/día hasta los 3 años, 5mg/día hasta los 8 años y 8mg/día hasta los 13 años, independientemente del sexo. En mujeres adultas se recomienda una ingesta de 8mg/día y en el hombre adulto 11mg/día <sup>290</sup>. Durante el embarazo y lactancia los requerimientos diarios aumentan significativamente, En el embarazo se recomienda ingerir 11mg/día, y durante la lactancia el requerimiento llega a los 13mg/día. En esta etapa los niveles plasmáticos maternos disminuyen, además, por la hemodilución característica de esta etapa. La absorción intestinal no se modifica sustancialmente, por lo que el zinc adicional demandado por el feto en desarrollo y la madre gestante solo puede ser aportado aumentando el contenido de zinc en la dieta. Solo así se podría evitar la depleción de las reservas de zinc en el tejido materno <sup>290</sup>.

En cuanto a la biodisponibilidad del zinc, se considera que la dieta occidental promedio presenta una biodisponibilidad del 30% para el zinc. Sin embargo, se presume que en África y Latinoamérica la biodisponibilidad es menor, ya que las dietas características de estas regiones contienen mayor proporción de fitatos, y calcio derivado de la nixtamalización del maíz (cocción con agua y cal para remover la cascara), que como ya mencionamos, interfieren la correcta absorción del elemento. Esto conjugado a que son dietas con menor proporción de proteína animal, contribuyen a una distribución más amplia de la desnutrición oculta de este micronutriente <sup>291</sup>.

Actualmente la OMS, UNICEF y el IZiNCG (Grupo de Consulta Internacional sobre Nutrición del Zinc) recomiendan la medición del zinc plasmático o sérico como indicador bioquímico para evaluar el estado nutricional del mismo. Esta recomendación surgió luego de evaluar la respuesta de este y otros indicadores bioquímicos ante la suplementación en diferentes poblaciones <sup>279</sup>. Otros indicadores son útiles para evaluar los depósitos corporales de zinc a largo plazo, pero no la ingesta. Entre ellos se enumera la concentración de zinc en eritrocitos y leucocitos. Otros marcadores han sido propuestos como indicadores funcionales, entre ellos la actividad de enzimas como la fosfatasa alcalina, la SOD extracelular, la nucleósido fosforilasa y la ecto purina 5'nucleotidasa, todas metaloenzimas dependientes de zinc. El uso de estos marcadores funcionales es inespecífico, ya que su actividad no siempre guarda relación con el estado nutricional de zinc. El uso de isotopos diferentes como marcador de la cinética del zinc permite evaluar la cinética de los depósitos de intercambio

rápido y la tasa de depuración de los mismos cuando se realizan mediciones entre 1 y 2 meses tras la administración de los mismos <sup>292,293</sup>.

#### 1.4.4 Funciones biológicas del Zinc

El zinc posee propiedades antioxidantes, anti-apoptóticas, anti-inflamatorias y estabilizantes de membrana, y cumple roles importantes en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Se estima que entre el 3% y el 10% de los genes humanos codifican proteínas con dominios de unión al zinc <sup>294</sup>. El zinc participa de la regulación de la expresión génica a través de su unión a diversos factores de transcripción y receptores nucleares, entre ellos para la Vitamina D, esteroides y hormona tiroidea <sup>295</sup>. El zinc es esencial para la correcta actividad de más de 300 enzimas involucradas en metabolismo intermedio, síntesis de proteínas, utilización de energía y regulación del sistema cardiovascular <sup>296,297</sup>. Entre las que contienen zinc en su estructura y regulan la función del sistema cardiovascular, renal y el balance hidrosalino se pueden enumerar la ECA, la NOS, las endopeptidasas neutras y las MMP <sup>298,299</sup>.

El zinc además resulta primordial para el crecimiento y desarrollo. Se ha reportado que promueve la proliferación celular a través de muchas hormonas y enzimas que participan en la división celular y son dependientes de zinc para su funcionamiento y/o síntesis. Entre ellas se puede mencionar a la timidina kinasa, enzima involucrada en la síntesis de ADN, cuya expresión génica aumenta en presencia de zinc <sup>300</sup>, y las hormonas de crecimiento y factores de crecimiento insulino similares, cuya producción también se estimula en presencia de zinc <sup>301</sup>. Tiene además propiedades antiapoptóticas, ya que inhibe la actividad de la caspasa-3 <sup>302</sup>.

A pesar de que no participa en forma directa en reacciones de oxido-reducción, numerosos trabajos han demostrado que el zinc protege a las estructuras celulares del daño oxidativo. El zinc posee efecto antioxidante y estabilizante de membrana ya que compite por la unión a diferentes sitios de membrana con otros metales pesados que catalizan la producción de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrogeno <sup>303</sup>. El zinc además inhibe a la NADPH oxidasa, enzima asociada a la membrana plasmática cuya función es catalizar la producción de anión superóxido <sup>49</sup>. Su capacidad para unirse en forma reversible pero con alta afinidad le permite proteger de la oxidación a los grupos sulfhidrilos de las proteínas y del glutatión. Además participa del metabolismo de otros antioxidantes, como facilitador de la absorción linfática de la Vitamina E, manteniendo la concentración plasmática de la misma <sup>304</sup>. El zinc es

además un componente esencial de la SOD intra y extracelular<sup>305</sup>, y su déficit se asocia a reducción en la concentración de glutatión y en la actividad de la SOD, lo que aumenta significativamente el daño oxidativo a nivel celular<sup>306</sup>. El zinc también induce la síntesis de metalotioneínas, proteínas que actúan como *scavenger* de radicales libres<sup>309</sup>.

El zinc también participa del equilibrio de citoquinas pro y anti inflamatorias, disminuyendo la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1, y disminuyendo la activación de NF- $\kappa$ B, factores involucrados en la expresión de cascadas de cito y quimioquinas pro-inflamatorias<sup>311</sup>.

Respecto de la relación entre el zinc y el SRA, son varios los trabajos publicados que evidenciaron cambios en la actividad de la ECA en relación a la biodisponibilidad de zinc. White y cols demostraron que en ratas deficientes de zinc la actividad de la ECA era aproximadamente 25% menor respecto de sus controles. La incubación *in vitro* con cantidades equivalentes de zinc suplementario demostró que la actividad de ECA aumentaba más en las ratas deficientes que las ratas control (73% vs 30% de aumento de actividad)<sup>307</sup>. Reeves ya había evidenciado una reducción en la actividad de ECA en situaciones de baja concentración de zinc sérico, que podía ser revertida mediante la suplementación de zinc<sup>308</sup>. Demostraron luego la dependencia de la actividad de la ECA sobre las concentraciones de zinc, pero notaron que los cambios en la actividad no llevaban a cambios en la concentración de AngII sérica, tanto en cobayos como en ratas, ni vieron cambios en la concentración sérica de bradiquinina. Esto indica que la actividad de la ECA no resulta un paso limitante en la formación de AngII ante una dieta deficitaria en zinc<sup>310</sup>. Analizaron también el efecto de la deficiencia de zinc sobre la actividad de ECA en diferentes tejidos. Descubrieron que, en ratas con dieta deficiente en zinc, la concentración de zinc en testículos era menor que en los controles, sin observar cambios en la concentración de zinc a nivel pulmonar. En cuanto a la actividad de la ECA, evidenciaron una fuerte caída en la actividad de la ECA testicular, mientras que la actividad de la ECA pulmonar estaba fuertemente aumentada<sup>312</sup>. Esto sugiere que el organismo redirige el contenido corporal de zinc hacia diferentes órganos en función de su estado nutricional, y además evidencia que la respuesta de la actividad de la ECA al déficit de zinc puede variar según el tejido evaluado. Más recientemente y con relación a esto se ha descrito que el déficit y suplementación con zinc altera la relación de apo- y holo-ECA sérica. La relación aumenta ante un estado deficitario y baja luego con la suplementación<sup>313</sup>.

En cuanto a los efectos transcripcionales de la AngII relacionados a los efectos metabólicos del zinc, se han descrito varios factores de transcripción con dedos de zinc relacionados a vías de transducción de señal activadas por AngII. Entre ellas se enumeran el Egr-1, que se activa por señalización a través de AT<sub>1</sub> en células de corteza suprarrenal<sup>314</sup>, el Sp1, relacionado a la producción de factor de crecimiento derivado de plaquetas<sup>315</sup>, el factor 5 tipo Krüppel (KLF5), asociado a procesos de remodelado cardíaco y vascular inducidos por AngII<sup>316</sup>, y la proteína con dedos de zinc de la leucemia promielocítica (PLZF), que a través de su unión con AT<sub>2</sub> tras la estimulación con AngII también se ha implicado en procesos de remodelado cardíaco<sup>317</sup>. Algunos de estos además regulan la expresión de diferentes componentes del SRA, por ejemplo la PLZF puede promover la síntesis de AT<sub>2</sub> así como reprimir la expresión del RPR en tejido neuronal<sup>318</sup>. Este puñado de factores, lejos de explicar los efectos de la deficiencia de zinc sobre el SRA, ejemplifica la multiplicidad de niveles de interacción entre el zinc y el SRA.

#### **1.4.5 Efectos del Déficit de Zinc**

Algunos de los signos que se observan en la carencia de zinc incluyen retraso en el crecimiento, anorexia, letargia mental, alteraciones neurosensoriales e hipogonadismo<sup>293</sup>. También se ha asociado la carencia de zinc con el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, la enfermedad de Alzheimer y distintos tipos de cáncer, entre otras<sup>322</sup>. Durante el embarazo, la deficiencia de zinc se asocia con mayor riesgo de aborto, parto prematuro, alteración del desarrollo fetal y dificultad en el trabajo de parto<sup>323,324</sup>.

Numerosos estudios han establecido una asociación entre la carencia de zinc y el desarrollo de HTA esencial<sup>319</sup> y con otras patologías vasculares inflamatorias como la aterosclerosis y enfermedad coronaria<sup>320</sup>.

#### **1.5 Antecedentes de Nuestro Laboratorio**

Estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio han establecido a la carencia de zinc durante la gestación como factor programador de HTA y enfermedad cardiovascular y renal en la adultez. Se ha demostrado que ratas expuestas a una dieta deficitaria en zinc durante la gestación presentan menor peso al nacer (marcador de RCIU). Además, al llegar a la adultez, los machos desarrollan HTA, acompañado de alteraciones vasculares, renales y cardíacas. En el caso de las hembras, aunque no evidenciamos el desarrollo de HTA pudimos observar cambios sutiles que sugieren que existe una impronta por la injuria durante la vida fetal y la lactancia. Esto sugirió

que la programación de ECV en este modelo de programación fetal es dependiente del sexo <sup>321</sup>.

Entre las alteraciones observadas en los riñones de las ratas macho se evidenció, a los 81 días de vida, una disminución en el número de nefronas y en la superficie de filtrado con la consecuente caída en la TFG. Estas alteraciones se acompañaron de la activación de procesos apoptóticos y la disminución en la actividad del sistema del NO renal y el aumento del estrés oxidativo a través de la reducción del contenido de glutatión, y de la actividad de la SOD y la glutatión peroxidasa. Estas alteraciones no fueron revertidas cuando se restableció un aporte adecuado de zinc luego del destete <sup>272,273,325</sup>. Algunas de estas alteraciones también se observaron en machos de 21 días de vida sometidos a una restricción de zinc durante la gestación y la lactancia. Se evidenció una disminución de la actividad del sistema del NO renal y aumento del estrés oxidativo tisular <sup>326</sup>.

A nivel vascular, evidenciamos la programación de disfunción endotelial en ratas de ambos sexos. Esta disfunción se caracterizó por una menor actividad del sistema del NO. A los 6 días de vida, las ratas deficientes en zinc presentaron una menor actividad de la NOS en la aorta, que se acompañó con un aumento del estrés oxidativo. Esta disminución en la actividad de la NOS aórtica persistió hasta la adultez en las ratas macho y hembras, y tuvo consecuencias funcionales. Las ratas adultas de ambos sexos sometidas a una restricción de zinc durante la gestación y la lactancia presentaron una menor respuesta vasodilatadora dependiente de la eNOS en la aorta, efecto que no se revertió con la administración de una dieta adecuada en zinc postdestete. Esta disfunción endotelial es un acontecimiento temprano de importancia fisiopatológica, dado que inicia el proceso aterosclerótico que precede a la aparición ECV. Asociado a esto evidenciamos, en ratas macho adultas, una disminución en la reactividad vascular de la aorta en respuesta a fenilefrina. En ratas macho adultas expuestas a deficiencia de zinc desde la gestación y por toda la vida observamos signos de remodelado hipertrófico de las arterias de resistencia en riñón y aumento en el depósito de colágeno en la capa media de la aorta. Estos podrían ser algunos de los factores condicionantes para la aparición de HTA y enfermedad vascular en este modelo. Asimismo, observamos que los machos fueron más sensibles que las hembras a todos estos efectos <sup>327,328</sup>.

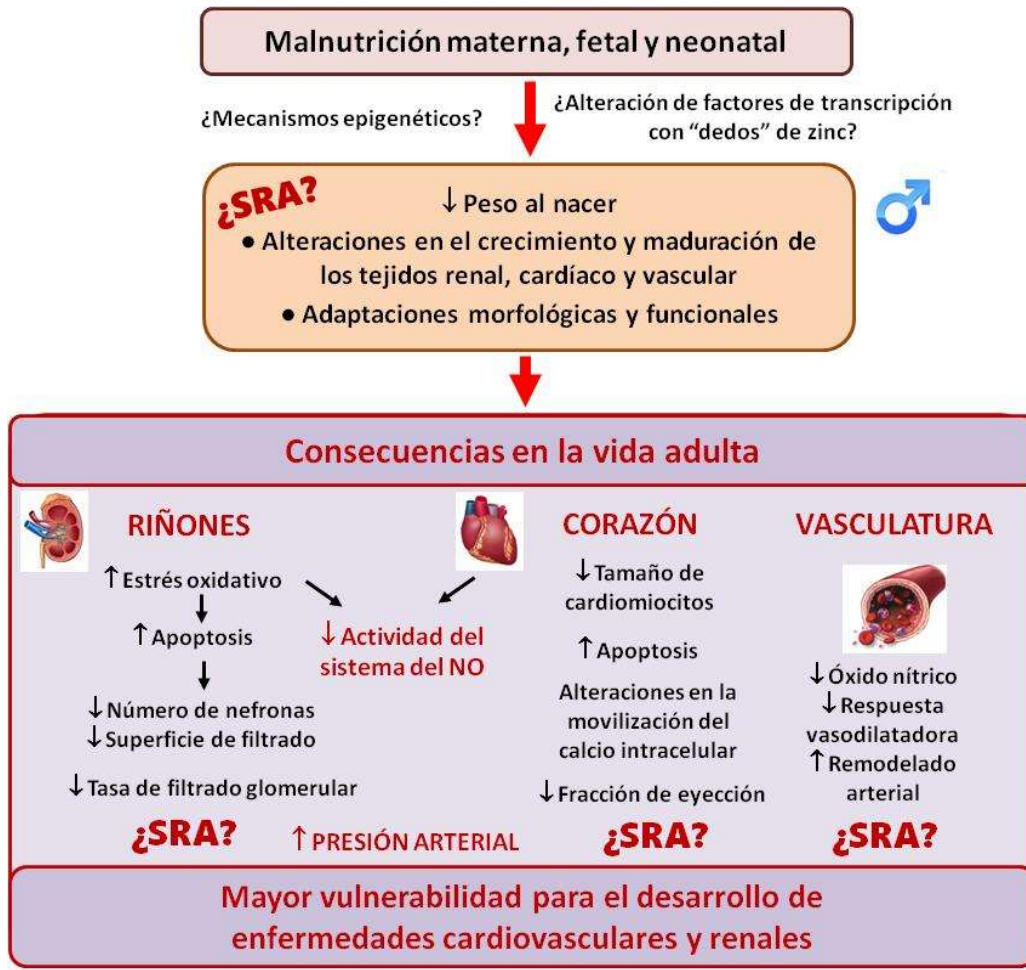
En trabajos previos en este modelo de programación fetal observamos una disminución del tamaño de los miocitos y de los espesores parietales del ventrículo izquierdo que se asociaron a una menor contractilidad cardíaca en este grupo en

machos expuestos a restricción de zinc. Estuvieron acompañados de una menor actividad del sistema del NO, así como un aumento de la apoptosis, la inflamación y la actividad de los sistemas anti-oxidantes. En miocitos aislados se observó además una menor disponibilidad de calcio citoplasmático y una reducción en el acortamiento celular. Algunas de estas alteraciones se evidenciaron desde etapas tempranas de la vida: animales deficientes a los 6 y 21 días de vida presentaban una menor masa cardíaca, con aumento en el número de células apoptóticas en el ventrículo izquierdo. La restitución de una dieta adecuada en zinc postdestete solo logró revertir algunos de estos fenómenos, entre ellos: el tamaño de los miocitos y los índices de apoptosis e inflamación. Esto contribuiría a mantener la función contráctil en este grupo de animales. Sin embargo, no se observaron beneficios en los valores de PA <sup>328,329</sup>.

En las hembras sometidas a restricción de zinc en la gestación y lactancia no se observaron alteraciones significativas en la función ventricular, así como no se evidenció un aumento de la PA. Sin embargo, pudimos observar un aumento de la apoptosis e inflamación, así como una disminución en el sistema del NO en VI, aunque al comparar estos parámetros con los hallados en los machos los cambios observados eran menos marcados, lo que remarca nuevamente el papel del sexo en la determinación de ECV en este modelo de programación fetal <sup>329,330</sup>.

En base a todos estos hallazgos (condensados en la figura 5) y dada la importancia del SRA en el desarrollo renal y cardiovascular, así como el papel que cumple en la regulación de la PA y los procesos de adaptación a la HTA, nos propusimos evaluar el papel del SRA en este modelo de programación fetal de ECV.

## RESTRICCIÓN DIETARIA DE ZINC



*Figura 5: Resumen de los hallazgos de nuestro laboratorio en relación al desarrollo de ECV en un modelo de programación fetal por restricción de zinc. Perspectivas a futuro.*



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La HTA es uno de los factores de riesgo más prevalentes que favorece el desarrollo de disfunción endotelial, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal. A pesar de los notables avances en el conocimiento de sus mecanismos etiopatogénicos, existe una permanente búsqueda de los factores y mecanismos que se encuentran involucrados en su generación y tratamiento. Actualmente, se le ha dado relevancia a la programación fetal como un factor importante en el desarrollo de ECV.

En nuestro laboratorio, hace más de 10 años que estudiamos el impacto de la deficiencia moderada de zinc durante diferentes periodos de la vida en los sistemas cardiovascular y renal. Nuestro grupo de trabajo demostró que la restricción dietaria de este micronutriente durante la vida fetal y postnatal induce alteraciones en la estructura y función renal y cardiovascular, que predisponen al desarrollo de ECV, como la HTA, en la vida adulta de ratas machos.

El SRA juega un importante papel en el desarrollo fetal y se ha comprobado que su alteración participaría en la etiología de la HTA programada en el útero. Sin embargo, el rol del SRA en los diferentes sistemas, tanto cardiovascular como renal, no ha sido estudiado en este modelo experimental, así como tampoco su implicancia en los efectos de esta deficiencia en las diferencias de sexo.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Sobre la base de los antecedentes presentados y de los resultados previamente obtenidos en nuestro grupo de trabajo, planteamos la siguiente hipótesis:

### **2.1. HIPÓTESIS**

***“El insuficiente aporte de zinc durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano induce modificaciones en diversos mecanismos celulares y tisulares, que en forma independiente o conjunta conducen a alteraciones cardiovasculares y renales en el adulto. Dichas alteraciones se deben, en parte, a la activación del SRA y a una respuesta alterada de los sistemas cardiovascular y renal a la AngII. Las alteraciones provocadas por la deficiencia de zinc son más evidentes en los machos que en las hembras.”***

## 2.2. Objetivos generales

Con el fin de demostrar la hipótesis planteada, los objetivos generales de este de trabajo de tesis doctoral fueron:

1. Estudiar el SRA renal y la morfología de dicho órgano durante etapas tempranas del crecimiento en ratas machos y hembras expuestas a una restricción moderada de zinc durante la vida fetal y posnatal.
2. Estudiar la participación del SRA renal y cardiovascular en la vida adulta de ratas de ambos sexos expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y posnatal.
3. Evaluar la respuesta de la infusión crónica de AngII sobre la presión arterial y el sistema cardiovascular y renal en los animales adultos machos expuestos a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento

## 2.3. Objetivos específicos:

1. Dado que es conocido que el SRA está involucrado en los procesos de crecimiento, diferenciación y apoptosis renales, se plantea el siguiente objetivo específico:

- 1.1. Evaluar la morfología renal en ratas machos y hembras de 6 días de vida, expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento posdestete.
- 1.2. Estudiar el SRA renal en ratas machos y hembras de 6 días de vida, expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento posdestete.

2. Dado que es conocido que el SRA está involucrado en la regulación del balance hidrosalino y en el desarrollo de la hipertrofia, la fibrosis y el estrés oxidativo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 2.1. Evaluar el SRA renal en ratas machos y hembras de 81 días de vida, expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento postdestete.

2.2. Estudiar el SRA cardíaco en ratas machos y hembras de 81 días de vida, expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento postdestete.

2.3. Determinar la producción de anión superóxido dependiente de la NADPH oxidasa en el tejido cardíaco de ratas machos y hembras de 81 días de vida, expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento postdestete.

2.4. Evaluar la respuesta contráctil de la AngII en anillos de aorta torácica de animales adultos sometidos a la deficiencia de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento postdestete.

**3.** Dada la relevancia de la AngII en la regulación de la presión arterial y en el remodelado morfológico y en los procesos inflamatorios tanto a nivel renal y cardiovascular, se plantea el siguiente objetivo específico:

3.1. Evaluar la respuesta de la infusión crónica de AngII sobre la presión arterial en los animales adultos machos expuestos a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento.

3.2. Evaluar la respuesta de la infusión crónica de AngII sobre el remodelado de la arteria aorta y arterias de los tejidos cardíaco y renal en los animales adultos machos expuestos a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento.

3.3. Evaluar la respuesta de la infusión crónica de AngII sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en los animales adultos machos expuestos a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento.

**4.** Determinar si las alteraciones del SRA cardiovascular y renal inducidas por la deficiencia de zinc durante la vida fetal y la lactancia en ratas machos y hembras, pueden ser corregidas por el adecuado aporte de zinc luego del destete.

**5.** Evaluar si existen diferencias de sexo en este modelo de programación fetal.

### **3. MODELO Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

### 3.1 Modelo experimental

El estudio se llevó a cabo en ratas Wistar machos y hembras exocriadas. Al momento del apareo, las ratas tenían entre 3 y 4 meses de vida, las hembras pesaban entre 250 - 300 g, mientras que los machos pesaban entre 300 - 350 g. Previo al apareo, las ratas hembras se expusieron por 2 días a la viruta proveniente de los machos con los que se las iba a aparear. Este procedimiento garantiza un adecuado ciclado de las ratas. Posteriormente se realizó el apareo durante una semana. Se corroboró la potencialidad de la preñez al evaluar la pérdida del tapón mucoso.

Luego del apareo, las hembras preñadas fueron separadas en dos grupos al azar y se las alimentó con diferentes dietas desde el inicio de la preñez hasta el momento del destete de las crías:

- **MC:** ratas madres que recibieron dieta control (30 ppm de zinc, ingesta diaria recomendada de zinc para roedores durante los períodos de preñez y lactancia);
- **MB:** ratas madres que recibieron dieta con bajo contenido en zinc (8 ppm de zinc, restricción moderada).

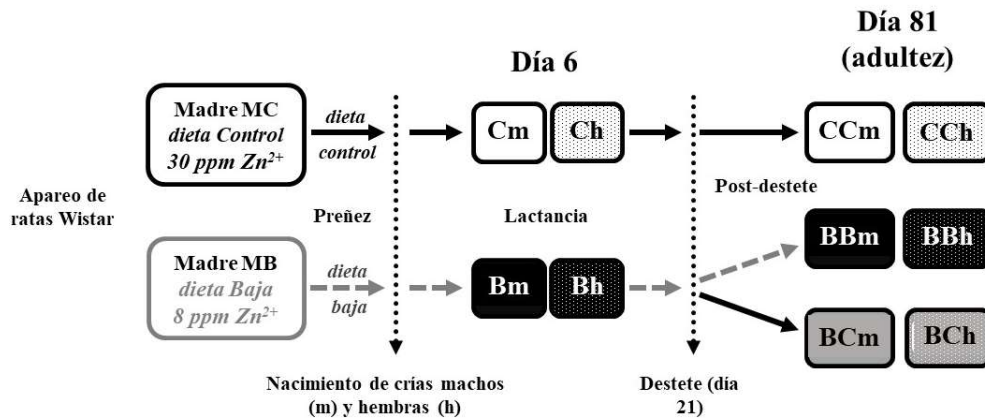
El período de preñez en la rata tiene una duración de 21 días. Al sexto día de nacimiento de los animales, algunos fueron sacrificados para su estudio, quedando conformados los siguientes grupos experimentales:

- **Cm y Ch:** crías machos (m) y hembras (h) de 6 días de vida, nacidas de madres MC, que recibieron dieta control durante la etapa fetal y la lactancia;
- **Bm y Bh:** crías m y h de 6 días de vida, nacidas de madres MB, que recibieron dieta baja en zinc durante la etapa fetal y la lactancia.

A partir del sexto día de vida se conservaron 8 crías por camada (4 hembras y 4 machos) para asegurar una adecuada alimentación durante la lactancia. Las crías fueron destetadas a los 21 días de vida y colocadas en jaulas individuales. A partir de ese momento, las crías nacidas de madres controles continuaron con la dieta control durante 60 días. Las crías provenientes de las madres deficientes en zinc fueron aleatorizadas en dos grupos: recibieron dieta control (c, 30 ppm de zinc, ingesta diaria recomendada de zinc para roedores durante los períodos de crecimiento) o dieta baja en zinc (b, 8 ppm de zinc, restricción moderada) durante 60 días posdestete (*figura 3.1*). De este modo quedaron conformados los siguientes grupos experimentales:

- **Ccm** y **Cch**: crías m y h que recibieron dieta control durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento post-destete;
- **Bbm** y **Bbh**: crías m y h que recibieron dieta baja en zinc durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento post-destete;
- **Bcm** y **Bch**: crías m y h que recibieron dieta baja en zinc durante la vida fetal y la lactancia, y dieta control durante el crecimiento post-destete.

Al final del periodo experimental, correspondiente a los 81 días de vida de las crías, los animales fueron sacrificados por decapitación para realizar los estudios que se detallan en la metodología.



**Figura 3.1.** Modelo experimental de deficiencia moderada de zinc durante la preñez, la lactancia y el crecimiento post-destete.

Todas las dietas aportaron la cantidad necesaria de nutrientes requerida para los periodos de preñez, lactancia y crecimiento, según las recomendaciones AIN-93 (Reeves PG, 1997), como se muestra en la **Tabla 3.1**. Las mismas se diferencian solamente en el contenido de zinc de las mezclas de minerales. El contenido de zinc de las dietas fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica.

Los animales tuvieron libre acceso a las dietas y al agua desionizada y fueron criados en jaulas de acrílico individuales en un ambiente de humedad (45-55%) y temperatura (20-22°C) controladas y con un ciclo luz-oscuridad de 12 h en el bioterio

de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El cuidado de los animales se llevó a cabo según los lineamientos de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT, Resolución 6344/96) y de la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto de Salud Nacional de los Estados Unidos (Publicación del NIH N° 85-23, Revisado 1996). Los protocolos experimentales a realizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-FFyB; CUDAP: EXP-UBA:0051018/15).

<b>Dieta</b>	<b>AIN-93</b>	<b>Control</b>	<b>Baja</b>
Caseinato de calcio	200	200	200
Aceite de maíz	70	70	70
Mezcla de minerales*	35	35	-
Mezcla de minerales- libre de zinc <sup>†</sup>	-	-	35
Mezcla de vitaminas <sup>§</sup>	10	10	10
Colina	1	1	1
Dextrina	684	684	684
<b>Zinc<sup>¶</sup></b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>0.008</b>

**Tabla 3.1. Recomendaciones nutricionales para roedores en crecimiento y composición de dietas experimentales (g/kg de dieta).** \*Composición (g/kg mezcla):

carbonato de calcio (142,7), fosfato dibásico de potasio (301,6), cloruro de sodio (176,5), sulfato de magnesio heptahidrato (146,9), citrato de hierro y amonio (6,06), cloruro de zinc (1,79), sulfato de manganeso monohidrato (0,92), sulfato de cobre pentahidrato (0,63), yoduro de potasio (0,0078), selenato de sodio anhidro (0,01025), molibdato de amonio tetrahidrato (0,008), sacarosa (223).

<sup>†</sup>Composición: idéntica a la mezcla de minerales, pero sin cloruro de zinc. <sup>§</sup>Composición (g/kg mezcla): ácido nicotínico (3), pantotenato de calcio (1,6), piridoxina HCl - vitamina B6 (0,7), tiamina-HCl - vitamina B1 (0,6), riboflavina - vitamina B2 (0,6), ácido fólico (0,2), vitamina B12, 0,1% triturada en manitol (2,5), vitamina D3 - colecalciferol, 40.000.000 U/g (0,0025), vitamina K - menadiona (0,029), sacarosa (990,7485). Soluciones de vitaminas (ml a agregar a 1 kg de dieta): vitamina E -  $\alpha$ -Tocoferol 750 U/10 ml en aceite de maíz, vitamina A - retinil palmitato,



1.700.000IU/g 4000 U/ml en aceite de maíz. <sup>δ</sup>El contenido de zinc presente en la dieta baja resulta de la presencia de trazas de zinc en los otros componentes de la dieta.

### 3.2 Protocolo experimental I

#### **Estudio del SRA renal y cardiovascular en etapas tempranas del crecimiento y en la vida adulta de ratas machos y hembras expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y postnatal**

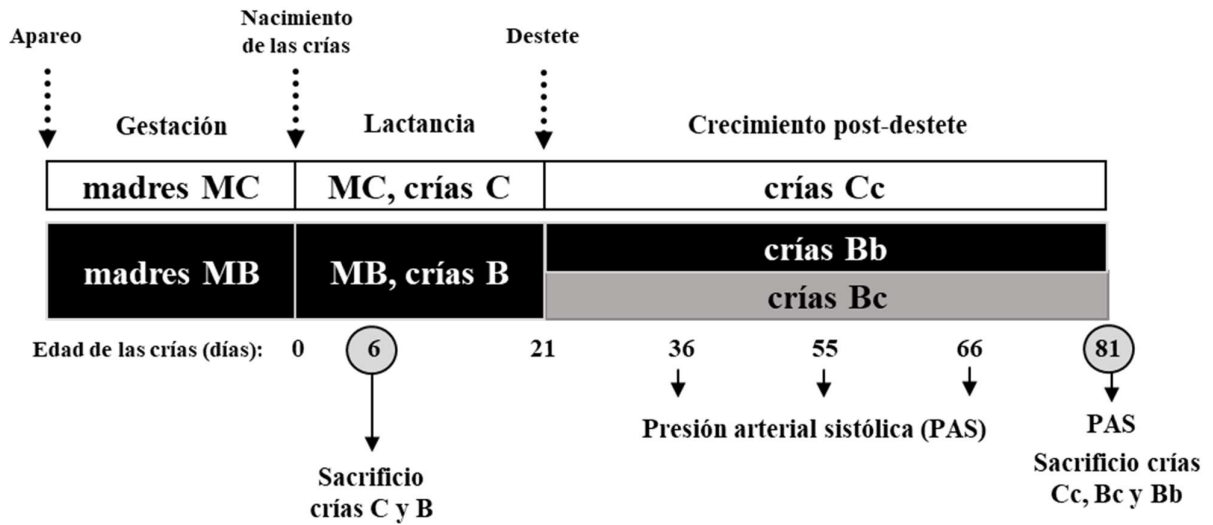
Se midieron el consumo de alimento y los pesos corporales de las madres desde el inicio del apareo (día 0 de gestación) hasta los 21 días de lactancia. Se extrajeron muestras de sangre de la cola de las madres luego del destete.

A los 6 días de vida de las crías, se determinó el peso corporal de las mismas y algunas fueron sacrificadas por decapitación (grupos experimentales Cm, Ch, Bm y Bh). Se obtuvieron muestras de sangre y se extrajeron los riñones y las tibias de ambos miembros inferiores.

Las crías que no fueron sacrificadas al día 6, continuaron con sus madres hasta el día 21 (destete). Se determinó el consumo de alimento de las ratas de los grupos Ccm, Cch, Bbm, Bbh, Bcm y Bch. La presión arterial sistólica (PAS) de los animales fue medida a los 36, 51, 66 y 81 días de vida.

Al finalizar el período experimental (81 días de vida), los animales fueron sacrificados por decapitación, se obtuvieron muestras de sangre y rápidamente se extrajeron los riñones, el corazón, la arteria aorta torácica y las tibias de ambos miembros inferiores.

La **figura 3.2** muestra el protocolo experimental I de deficiencia moderada de zinc durante la preñez, la lactancia y el crecimiento post-destete.



**Figura 3.2. Protocolo experimental I.**

### 3.3 Determinaciones realizadas: Protocolo I

- ❖ Medición del peso corporal y el consumo de alimento de las ratas madres durante los períodos de gestación y lactancia
- ❖ Medición del consumo de alimento, el peso corporal, el peso de los tejidos renal y cardíaco y la longitud de la tibia en las crías de 6 y 81 días de vida
- ❖ Determinación de la concentración sérica de zinc en las madres y en las crías de 6 y 81 días de vida
- ❖ Evaluación histológica de tejido renal en ratas de 6 días de vida
  - Parámetros morfométricos de la zona cortical y yuxtamedular
  - Depósito de colágeno en glomérulos, túbulos e intersticio peritubular de la corteza renal
  - Número de células apoptóticas en área cortical renal
- ❖ Evaluación del SRA a los 6 días de vida en tejido renal
  - Medición del contenido tisular de AngII y Ang-(1-7) por radioinmunoensayo
  - Inmunolocalización de AngII por técnica inmunohistoquímica (IHQ)

- Determinación de los niveles del ARNm de ECA, ECA2, y de receptores AT<sub>1a</sub> y AT<sub>2</sub> por RT-qPCR
- Determinación de los niveles proteicos de ECA y de receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> por western blot
- Inmunolocalización de receptores AT<sub>1</sub> por técnica por IHQ
- ❖ Medición de la presión arterial sistólica a los 36, 51, 66 y 81 días de vida mediante el método *tailcuff*.
- ❖ Evaluación del SRA a los 81 días de vida en la corteza renal
  - Medición del contenido tisular de AngII y Ang-(1-7) por radioinmunoensayo
  - Inmunolocalización de AngII por técnica por IHQ
  - Determinación de los niveles del ARNm de ECA, ECA2, y de receptores AT<sub>1a</sub> y AT<sub>2</sub> por RT-qPCR
  - Determinación de los niveles proteicos de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> por western blot
  - Inmunolocalización de receptores AT<sub>1</sub> por técnica (IHQ)
- ❖ Evaluación del SRA a los 81 días de vida en el ventrículo izquierdo:
  - Medición del contenido tisular de AngII y Ang-(1-7) por radioinmunoensayo
  - Determinación de los niveles del ARNm de ECA, ECA2, y del receptor AT<sub>1a</sub> por RT-qPCR
  - Determinación de los niveles proteicos de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> por western blot
- ❖ Determinación de la producción de anión superóxido inducida por NADPH en el ventrículo izquierdo
- ❖ Estudios a los 81 días de vida en la aorta torácica:
  - Evaluación de la función vascular en aorta torácica: respuesta vasoconstrictora frente a AngII en anillos de aorta torácica en baño aislado

- Inmunolocalización y cuantificación de receptores AT<sub>1</sub> mediante la técnica de IHQ

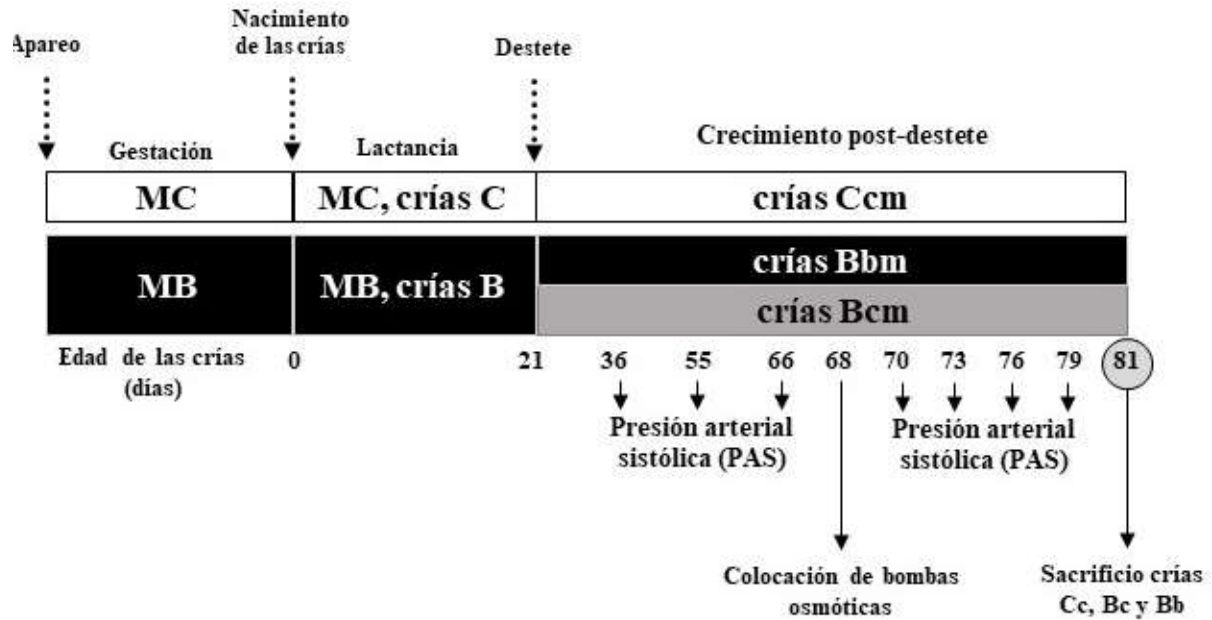
### 3.4 Protocolo experimental II

#### Estudio de los efectos de la infusión crónica de AngII sobre el sistema cardiovascular y renal en los animales adultos machos, expuestos a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y el crecimiento

Un grupo de animales Ccm, Bcm y Bbm recibió una infusión subcutánea de AngII (65 ng/min) durante 14 días utilizando bombas osmóticas (Modelo 2002, Alzet, Palo Alto, USA). Otro grupo de animales recibió una infusión de NaCl 0.9 % (SF) durante 14 días a modo de control. Las mismas fueron implantadas 14 días antes de la finalización del período experimental (día 68). Quedaron conformados los siguientes grupos experimentales:

- **Ccm AII, Bbm AII y Bcm AII:** ratas macho Wistar que recibieron dieta control o deficiente en zinc durante la vida fetal, postnatal temprana y/o la adultez y que a los 68 días de vida, recibieron una infusión crónica, por vía subcutánea, de Ang II disuelto en NaCl 0,9%, durante 14 días.
- **Ccm SF, Bbm SF y Bcm SF:** ratas macho Wistar que recibieron dieta control o deficiente en zinc durante la vida fetal, postnatal temprana y/o la adultez y que a los 68 días de vida, recibieron una infusión crónica de NaCl 0,9%, administrada por vía subcutánea, durante 14 días.

La **figura 3.3** muestra el diseño experimental realizado en el protocolo II.



**Figura 3.3: Protocolo experimental II**

### 3.5 Determinaciones realizadas: Protocolo II

- ❖ Se registró la presión arterial sistólica (PAS) en las ratas conscientes, cada 3 días a partir del día 68 de vida, mediante el método *tailcuff*.
- ❖ Estudios morfológicos en la arteria aorta, el corazón y el riñón:
  - Se evaluó el colágeno perivascular de las arterias del ventrículo izquierdo y de las arterias del riñón mediante la coloración de Sirius Red (Aldrich Chemical Co) y contra-tinción con fast-green.
  - Se evaluó el remodelado de la capa media de las arterias renales y cardíacas.
  - Se evaluó el área de colágeno I y III perivascular y presente en la capa media de la aorta mediante la coloración de Sirius Red (Aldrich Chemical Co) y contra-tinción con fast-green.
  - Se evaluó el remodelado de la capa media de la aorta torácica.
  - Se evaluaron marcadores proinflamatorios: interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) mediante IHQ en aorta, ventrículo izquierdo y riñón.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **PROTOCOLO I**

### **4.1 Animales**

El estudio se llevó a cabo en ratas Wistar machos y hembras exocriadas, tal como se describió en la **sección 3.1**.

Los animales tuvieron libre acceso a las dietas y al agua deionizada y fueron criados en jaulas de acrílico individuales en un ambiente de humedad (45-55%) y temperatura (20-22°C) controladas con un ciclo luz-oscuridad de 12 h en el bioterio de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El cuidado de los animales se llevó a cabo según los lineamientos de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT, Resolución 6344/96) y de la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto de Salud Nacional de los Estados Unidos (Publicación del NIH N° 85-23, Revisado 1996). Los protocolos experimentales realizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-FFyB; CUDAP: EXP-UBA:0051018/15).

### **4.2 Medición del peso corporal y del consumo de alimento de las ratas madre durante los períodos de gestación y lactancia**

Se registró el peso corporal de las ratas madres semanalmente, desde el inicio del apareo (día 0 de gestación) hasta los 21 días en balanza analítica (sensibilidad: 0,01 g) (Ohaus, modelo AR5120, USA). Las madres permanecieron en jaulas individuales de acrílico junto a sus crías hasta el momento del destete (día 21 post-nacimiento).

El consumo de alimento se determinó como la diferencia entre el peso del alimento el día que se llenó el comedero y el peso de alimento remanente 2 días después. Se expresó como el consumo promedio diario de las madres registrado durante los períodos de gestación y lactancia.

### **4.3 Medición del peso corporal, la ganancia de peso desde el día 21 hasta el día 81 de vida de las crías, el consumo de alimento y el largo de la tibia**

Luego del destete, las crías fueron puestas en jaulas individuales de acrílico. Se registró el peso corporal semanalmente, desde el día 21 de vida hasta el final del período experimental (81 días de vida) y en el día del sacrificio (día 6 y 81 respectivamente), en balanza analítica (sensibilidad: 0,01 g) (Ohaus, modelo AR5120, USA).

El consumo de alimento se determinó de la misma manera que para las ratas madres. Se expresó como el consumo promedio diario registrado durante el protocolo experimental. No fue necesario introducir en este trabajo un grupo de alimentación pareado (grupos de madres o crías que reciben igual cantidad de dieta control que el que consumieron las ratas con dieta baja en zinc) debido a que no se encontraron diferencias en el consumo de alimento entre los grupos experimentales.

Luego del sacrificio, de las ratas de 81 días se extrajeron las tibias de ambos miembros inferiores, se midió su longitud utilizando un calibre (Vernier Caliper, 0-150 mm, sensibilidad: 0,02 mm) y finalmente se calculó el promedio de longitud de tibia.

### **4.4 Medición de los pesos renales y cardíacos**

Una vez extraídos los riñones y corazones, estos fueron debidamente lavados en solución fisiológica y secados. Se pesaron ambos riñones de cada rata y se calculó el promedio. Se expresó el peso renal (PR; g) en relación al peso corporal (PC; cada 100 g) para las crías de 6 días y el PR en relación a la longitud de la tibia (LT; cm) para las crías de 81 días. Se informan los siguientes parámetros: PR/PC; PR/LT

Se registró el peso del corazón entero (PCor; mg), del ventrículo izquierdo (PVI; mg) y del derecho (PVD; mg) y el peso de las aurículas (PAU; mg). Los pesos cardíacos se expresaron en relación al promedio del largo de las tibias (LT; cm). Se informan los siguientes parámetros: PCor/LT; PVI/LT; PVD/LT; PAU/LT

Para todas las determinaciones se utilizó una balanza analítica (sensibilidad:  $\pm 0.0001$ ) (Ohaus Corporation, Modelo: EP64, Pine Brook, NJ, USA).



#### **4.5 Determinación de la concentración de zinc del alimento y de los sueros de los de las ratas madres y de sus crías**

Las crías fueron sacrificadas por decapitación. En ese momento se obtuvieron muestras de sangre que fueron incubadas en un baño termostatzado a 37°C durante 10 minutos hasta la formación del coágulo y luego fueron centrifugadas a temperatura ambiente a 2.000 rpm durante 10 minutos. En las madres, la determinación se realizó luego del destete de sus crías (día 21 post-nacimiento). El suero se diluyó 1/5 en agua deionizada para la posterior determinación de la concentración de zinc.

Las concentraciones de zinc en el alimento y en los sueros fueron determinadas por espectrofotometría de absorción atómica a una longitud de onda de 213,9 nm (Varian Spectrophotometer Spectr AA-20, llama de oxígeno-acetileno, Perkin-Elmer, Norwalk).

Las determinaciones se llevaron a cabo por Dr. Héctor Fasoli, Profesor Adjunto de Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires.

El material de Referencia NIST RM 8435 (leche entera en polvo) fue sometido a un tratamiento idéntico para verificar la exactitud y reproducibilidad del método analítico. Todo el material de laboratorio utilizado fue previamente lavado con ácido nítrico (20%) y agua deionizada, con el objetivo de evitar la contaminación de las muestras con zinc <sup>331</sup>.

#### **4.6 Registro de la presión arterial sistólica**

##### **Fundamento**

Las mediciones de presión arterial sistólica (PAS) se realizaron en ratas conscientes, por el método no invasivo de tail-cuff, utilizando un transductor de pulso (MP100 Pulse Transducer, PanLab), y fueron registradas con un polígrafo (Fisiógrafo modular Power Lab, Quad Bridge Amp, ADInstruments). Los datos obtenidos se procesaron con un programa de adquisición de datos (Powerlab 8/30 and Labchart, Australia). Los resultados se expresaron en mmHg.

## **Metodología**

Para obtener una medida de PAS fiable, las ratas fueron aclimatadas a la manipulación y al medio externo en cepos, acordes al tamaño de las ratas, y en un ambiente termostatzado y silencioso por 40 minutos. Se realizó la adaptación de los animales con 2-3 sesiones de medida donde únicamente se realizaba la inflación-deflación del manguito de presión, sin registrar los valores de PAS. Una lámpara fue utilizada para mantener una temperatura de 33-34°C durante las medidas, con la finalidad de mejorar la vasodilatación local en la cola del animal.

Después del período de adaptación, las ratas permanecieron relativamente imperturbables cuando se realizaron las medidas definitivas. Se realizaron las medidas de PAS cada 15 días luego del destete (a los 36, 51, 66 y 81 días de vida) y el valor de PAS fue calculado como el promedio de 5 mediciones. Se descartaron las medidas consideradas aberrantes por movimientos del animal o artefactos.

### **4.7 Evaluación de la morfología renal**

Tras el sacrificio de los animales a los 6 días de vida, los riñones fueron fijados con formalina tamponada al 10% durante 24 horas. Luego los tejidos fueron deshidratados utilizando concentraciones crecientes de etanol para incluirlos en tacos de parafina. Con un micrótopo se realizaron cortes longitudinales de 4 µm de espesor. Los preparados fueron teñidos con hematoxilina-eosina, Sirius Red o tricrómico de Masson para evaluar los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno, respectivamente.

El estudio de los preparados histológicos se realizó con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Qcolor 3, Olympus America Inc., Richmond Hill, Ontario, Canadá). Las imágenes se analizaron con el software Image-Pro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD). Las mediciones se realizaron a doble ciego y bajo similares condiciones de luz, ganancia, compensación, y magnificación.

#### 4.7.1 Determinación de los parámetros morfométricos renales

##### Fundamento

Se utilizó la tinción con hematoxilina-eosina. La eosina es un colorante ácido, por lo cual se asocia y colorea estructuras catiónicas del citoplasma y la matriz extracelular, tales como los filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras extracelulares. La hematoxilina se asocia con mordientes para actuar como un colorante básico, por lo cual se asocia y colorea estructuras aniónicas: heterocromatina y nucléolos, ARN ribosomal, matriz extracelular.

##### Metodología

Los preparados de cortes longitudinales de riñón de 4  $\mu\text{m}$  de espesor fueron desparafinizados con xileno, rehidratados con soluciones alcohólicas de concentración decreciente y teñidos con solución acuosa de hematoxilina. Posteriormente, fueron deshidratados con soluciones alcohólicas de concentración creciente y teñidos con solución alcohólica de eosina. Finalmente se lavaron con xileno, se agregó un líquido de montaje no acuoso (bálsamo de Canadá) y se cubrieron con un cubreobjetos para lograr un preparado permanente.

Los diferentes parámetros morfométricos se examinaron en 10 áreas consecutivas corticales y yuxtamedulares de dos secciones por animal. El área glomerular total y el área capilar glomerular de las nefronas corticales y yuxtamedulares se determinaron con una magnificación de x400, cada campo correspondiente a un área de 1,367  $\text{mm}^2$  <sup>326</sup>.

#### 4.7.2 Evaluación de los depósitos de colágeno en corteza renal con Sirius Red

##### Fundamento

Se utilizó la tinción de Sirius Red. Este es un colorante aniónico que interactúa a través de sus grupos sulfónicos con los grupos básicos presentes en las moléculas de colágeno y, bajo luz visible, permite evaluar los depósitos de colágeno tipo I y III en los tejidos.

## Metodología

Se midieron los depósitos de colágeno en riñones de ratas de 6 días de vida. Los preparados de cortes longitudinales de riñón de 4  $\mu\text{m}$  de espesor fueron desparafinizados con xileno, rehidratados con soluciones alcohólicas de concentración decreciente y con una solución buffer fosfato de sodio de pH 7,4. Luego fueron sumergidos en una solución acuosa saturada en ácido pícrico de Sirius Red 0,5% p/v (Direct Red 80, Sigma 365548). Después de 2 lavados con HCl 0,01M, los cortes fueron deshidratados con soluciones alcohólicas de concentración creciente, se lavaron con xileno, se montaron con bálsamo de Canadá y se cubrieron con un cubreobjetos para lograr un preparado permanente <sup>332</sup>.

Se determinó el colágeno intersticial utilizando un score arbitrario en 10 campos visuales consecutivos (magnificación x400), correspondientes a dos secciones por animal, provenientes de sectores diferentes del riñón. Se utilizaron los siguientes Score:

- 0: normal o suave tinción alrededor de estructuras tubulares, glomerulares y vasculares.
- 1 (leve): leve tinción, dobla la tinción normal alrededor de estructuras tubulares, glomerulares y vasculares.
- 2 (moderada): tinción moderada del intersticio peri tubular y dentro de los glomérulos.
- 3 (severa): tinción intensa que reemplaza las estructuras glomerulares y tubulares y que compromete <25% del área cortical.
- 4 (muy severa): Tinción intensa que reemplaza las estructuras glomerulares y tubulares y que compromete >25% del área cortical.

### 4.7.3 Evaluación de los depósitos de colágeno en corteza renal con tinción tricrómica de Masson

#### Fundamento

La tinción tricrómica de Masson se utiliza para visualizar las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces y también, aunque en menor medida, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

## Metodología

Los preparados de cortes longitudinales de riñón de 4  $\mu\text{m}$  de espesor se colocaron en líquido de Bouin, 1 hora a 60°C como mordentaje. Posteriormente fueron desparafinizados en estufa a 60°C por 30 minutos, para luego sumergirse en xileno durante 10 minutos. Se rehidrató el tejido con soluciones alcohólicas de concentración decreciente. Los cortes se lavaron con agua destilada hasta desaparición del color amarillo. Se procedió a la tinción con hematoxilina férrica por 10 minutos, lavando con agua corriente por el mismo tiempo. Luego de un lavado con agua destilada, se tiñeron los preparados con solución de escarlata-fucsina ácida, durante 5 minutos, tras lo cual se lavó con agua destilada. Los tejidos se trataron con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 15 minutos y se tiñeron con solución de azul de anilina por 15 minutos. Luego de los lavados, se trataron los preparados con solución de ácido acético al 1% durante 5 minutos y los cortes fueron deshidratados con soluciones alcohólicas de concentración creciente, lavados con xileno, se montaron con bálsamo de Canadá y se cubrieron con un cubreobjetos para lograr un preparado permanente.<sup>336</sup>

Se determinó el colágeno intersticial en 10 campos visuales consecutivos (magnificación x400), correspondientes a dos secciones por animal, provenientes de sectores diferentes del riñón. Se utilizó el mismo score que se detalla en la **sección 4.7.2**.

### 4.7.4 Determinación de apoptosis o muerte celular programada: Técnica de TUNEL.

#### Fundamento

El ensayo de TUNEL se llevó a cabo para detectar aquellas células de la corteza renal que hayan sufrido apoptosis. Para ello, se utilizó el kit DeadEnd T, Colorimetric System que permite la identificación de los extremos 3'-OH libres de los fragmentos del ADN genómico clivado como consecuencia de los procesos de apoptosis. Nucleótidos biotinilados son incorporados al extremo 3'-OH del ADN usando la enzima desoxinucleotidil transferasa recombinante. Estos nucleótidos son posteriormente marcados utilizando el conjugado estreptoavidina-peroxidasa de

rábano y detectados con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina. De este modo, los núcleos apoptóticos son marcados de color marrón <sup>333</sup>.

### **Métodología**

Se realizaron cortes longitudinales de riñón de ratas de 6 días de vida de 4 µm de grosor, Posteriormente se los desparafinizaron con xileno y luego se rehidrataron en grados decrecientes de etanol. Los cortes de tejido fueron fijados por inmersión en solución de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se los permeabilizó por incubación en proteínasa K (20 µg/ml) durante 15 minutos. Luego de volver a fijar los cortes con solución de paraformaldehído al 4% durante 5 minutos, se los incubó en buffer de equilibrio durante 10 minutos. Todos estos procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente. Los cortes fueron posteriormente tratados con una mezcla de nucleótidos biotinilados y la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) en el buffer de reacción durante 60 minutos a 37° C dentro de una cámara húmeda para marcar los extremos del ADN fragmentado de las células apoptóticas. La actividad peroxidasa endógena en los tejidos fue bloqueada por incubación con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS durante 5 minutos. Posteriormente se los incubó con la solución del conjugado de estreptoavidina-peroxidasa de rábano durante 30 minutos y luego fueron coloreados con el cromógeno diaminobencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos. La contratinción se realizó con hematoxilina y luego los preparados se montaron utilizando un medio acuoso (10% glicerol) para el análisis por microscopía óptica.

**Control Positivo:** Un corte de cada tejido proveniente de una rata control fue tratado con una nucleasa del DNA previo a la realización de la técnica de TUNEL. La totalidad de las células presentaban marcación nuclear. Este control permitió confirmar que la permeabilización y la reacción de marcación fueron correctas.

**Control Negativo:** En un corte de cada tejido proveniente de una rata control se realizó la marcación de TUNEL sin el agregado de la TdT. Las células de este preparado no mostraron marcación nuclear.

Se determinó el número de núcleos apoptóticos sobre el número de núcleos totales en campos visuales consecutivos (magnificación x400), correspondientes a dos secciones por animal. Las observaciones se analizaron con el software Image-Pro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD) para el análisis de imágenes.

## 4.8 Evaluación del sistema renina angiotensina

### 4.8.1 Determinación del contenido de péptidos: AngII y Ang-(1-7)

#### Fundamentos y métodos

Se midió el contenido de AngII y Ang-(1-7) mediante la técnica de Radioinmunoensayo (*RIA*, sigla en inglés de *radioimmuno assay*) en los riñones de las crías a los 6 días de vida, y en la corteza renal y el ventrículo izquierdo de las crías de 81 días.

Esta técnica se realizó en el Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (*IQUIFIB-CONICET-UBA*) bajo la dirección y supervisión de la Dra. M. Gironacci.

Se utilizó [<sup>125</sup>I]AngII y [<sup>125</sup>I]Ang-(1-7) para la cuantificación de AngII y Ang-(1-7), respectivamente, las cuales fueron marcadas mediante el método de la lactoperoxidasa<sup>334</sup>. Para ello, 2 µg de AngII o Ang-(1-7) fueron incubadas con 20 µl de buffer fosfato 0,2 M (pH 7,4) en presencia de Na<sup>125</sup>I (0,15 mCi), 10 µg de lactoperoxidasa y 8 µl de peróxido de hidrógeno (1:15.000) durante 5 min. La reacción fue finalizada por el agregado de acetonitrilo 5% en ácido trifluoracético 0,1%. Los péptidos marcados fueron purificados por cromatografía líquida de alta performance en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo 5-35% en ácido trifluoracético 0,1% durante 50 min y un flujo de 0,8 ml/min.

Luego del sacrificio, los tejidos fueron rápidamente removidos y colocados en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. Posteriormente, fueron homogeneizados en una solución de etanol ácido (HCl 0,045 N), cada 1 g de tejido en 10 mL de buffer con la siguiente composición: 25 mM etilendiaminotetraacético (EDTA); 0,44 mM o-fenantrolina; 1 mM p-Cloromercuribenzoato (PCMB); 0,12 mM pepstatin A; 1,6 U aprotinina; 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 3µM inhibidor de renina acetil-His-Pro-Phe-Val-Statine-Leu-Phe y coctel inhibidor de proteasas. Luego fueron centrifugados a 14.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron purificados mediante el uso de columnas cromatográficas Sep-Pak-C18 Cartridges. Las columnas se activaron de la siguiente manera: 5mL de metanol, 5mL de tetrahidrofurano, 5mL de hexano, 5mL de metanol y 10mL de agua Milli-Q. Las muestras fueron cargadas dentro de la columna y eluidas mediante los siguientes pasos: 10ml de agua Milli-Q, 5ml de ácido acético al 4%, y 5ml de etanol/ácido acético/agua (90:4:6)<sup>335</sup>. El eluido del último paso fue liofilizado en un vaporizador centrífugo con

vacío Savant. Las muestras fueron resuspendidas con 100µl de buffer PRO (0,11 M Tris Base; 13 mM EDTA; 0,05% azida sódico; 0,5% cloruro de sodio; 0,1% PMSF; 0,1% de BSA, pH 7,4) e incubadas con el correspondiente péptido marcado y el anticuerpo anti-AngII o anti-Ang-(1-7) (1:10.000).

Para poder estimar la concentración de cada uno de los péptidos, concentraciones crecientes conocidas de AngII o Ang-(1-7) fueron incubadas con el péptido marcado y el correspondiente anticuerpo. Las incubaciones fueron realizadas durante toda la noche con agitación leve a 4°C. Así, el ligando frío desplaza al ligando marcado de los inmunocomplejos formados con el anticuerpo, siendo la cantidad del ligando marcado desplazado proporcional al ligando frío presente en la muestra. Al día siguiente, los inmunocomplejos fueron precipitados por incubación con suero de cabra anti-IgG de conejo y polietilenglicol 6,3% durante 1 h a 25°C y posteriormente centrifugados a 800 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y la radiactividad de los inmunocomplejos presentes en el sedimento fue cuantificada con un contador de centelleo sólido. La unión inespecífica se obtuvo incubando el ligando marcado en ausencia del anticuerpo específico. La unión total se obtuvo incubando el ligando marcado con el anticuerpo específico en ausencia del ligando frío. El valor de radiactividad obtenido fue corregido restando la radiactividad de la unión inespecífica. La fracción unida se obtuvo mediante la relación de la unión para cada condición sobre la unión total<sup>334</sup>. Se midieron los niveles de [<sup>125</sup>I]-Ang-(1-7) y [<sup>125</sup>I]-Ang II utilizando un contador de centello sólido gamma (equipo Wallac Wizard 1470 (Automatic gamma counter, Perkin-Elmer)).

#### **4.8.2 Determinación de los niveles de ARNm de ECA, ECA2 y de los receptores AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub>**

##### **Fundamentos y métodos**

Se midieron los niveles de ARNm de ECA, ECA2, AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub> mediante la técnica de qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa) en los riñones de crías de 6 días de vida, y en la corteza renal y el ventrículo izquierdo de las crías de 81 días.



El análisis genómico sugiere la existencia de al menos dos genes para el receptor AT<sub>1</sub> en la rata. El receptor AT<sub>1a</sub> y el receptor AT<sub>1b</sub> comparten 95% de homología de secuencia de aminoácidos. Regiones no codificadas de sus genes son sorprendentemente diferentes, lo que sugiere posibles diferencias en la expresión y regulación específica del receptor AT<sub>1a</sub> y receptor AT<sub>1b</sub>. De hecho, ambos subtipos de receptores son farmacológicamente y funcionalmente idénticos, pero difieren en la distribución tisular y la regulación transcripcional. El receptor AT<sub>1a</sub> está bien expresado en los tejidos cardiovascular y renal y es el principal regulador de la presión arterial. La expresión del receptor AT<sub>1b</sub> se limita a los tejidos endocrino tales como las glándulas suprarrenales y pituitarias<sup>337</sup>.

Se extrajo una porción de corteza renal y una del ápice del ventrículo izquierdo (VI) de aproximadamente 50 mg de peso cada una (se estimó que ese peso estaba contenido en un cubo de 3 x 3 mm de cada tejido, aproximadamente). Los tejidos fueron colocados en 500 µl reactivo estabilizante de ARNm (relación 1:10) (RNAlater RNA Stabilization Reagent, QIAGEN) y fueron guardados a -20°C. Para la extracción de ARNm se utilizó un kit de extracción de QIAGEN (RNeasy Tissue Mini Kit, para tejido renal, y RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, para ventrículo). De cada uno de los diferentes tejidos se pesó entre 10-20 mg y se homogeneizó en 600 µl del buffer correspondiente con β-mercaptoetanol (relación 100:1) (Rotor-Stator homogenizer). Luego se centrifugó a 13.000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante se mezcló con una parte de etanol 70% y fue transferido a la columna de extracción RNeasy spin. Esta fue centrifugada a 10.000 rpm durante 15 segundos, descartándose el eluido. Posteriormente, la columna con la muestra se trató con DNAsa I (relación 1:7 con buffer RDD) por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se eluyó la DNAsa I con buffer RW1 y se lavó la columna varias veces con buffer RPE (centrifugando a 10.000 rpm por 15 segundos y descartando el eluido). Por último, se eluyó de la columna el ARNm dos veces, y en 30 µl de agua libre de nucleasas se evaluó el rendimiento y la pureza con la relación 260/280 (GEN 5, take 3 session), almacenándose a -80°C. 1 µg de ARNm fue convertido en ADNc. Para ello, se incubó en baño seco a 65°C por 5 minutos: 1 µg de ARNm, 1 µl de Oligo(dT) primers (100pmol) y se llevó a volumen final 12,5 µl con agua DEPEC. Luego se colocó la muestra en hielo por 1-2 minutos. Para la conversión a ADNc se utilizó por muestra:

- Buffer de Reaccion 5x: 4 µl
- RiboLock RNase Inhibitor: 0,5 µl
- dNTP mix: 2 µl

- Enzima RevertAid Transcriptase: 1  $\mu$ l

Se agregaron 7,5  $\mu$ l de esta mezcla a cada muestra, obteniéndose un volumen final de 20  $\mu$ l. Las condiciones del ciclado fueron las siguiente: 60 minutos a 42°C; 10 minutos a 70°C e infinito a 4°C. Las muestras se guardaron posteriormente a -20°C.

Para la amplificación de los genes de interés y de referencia se utilizaron (Rotor-Gene Q, QIAGEN) 6 $\mu$ l de muestra o agua libre de nucleasas o control positivo o control negativo, con 0,5 $\mu$ l de primer específico (Forward y Reverse) y 12,5 $\mu$ l de mezcla real. Los primers específicos, la temperatura de annealing y la longitud del producto se muestran en la tabla 4.1

Gen	Secuencia del primer	Annealing	Longitud del producto
<b>ECA</b>	F: 5'-GTCCCGGAAATACGAAGAATTG-3'	58°C	137 pb
	R: 5'-CTGCATCAGAGTAGCCGTTGAG-3'	35 segundos	
<b>ECA2</b>	F: 5'-GCGCTGTCACCAGACAAGAA-3'	58°C	131 pb
	R: 5'-TCGTCCAATCCTGGTTCAAGT-3'	35 segundos	
<b>AT<sub>1A</sub></b>	F: 5'-TCTCAGCTCTGCCACATTCC-3'	56°C	121 pb
	R: 5'-CGAAATCCACTTGACCTGGTG-3'	35 segundos	
<b>AT<sub>2</sub></b>	F: 5'-CATTATTGACCTGGCACTT-3'	58°C	116 pb
	R: 5'-CACACTACGGAGCTTCTGTT-3'	35 segundos	
<b>GAPDH</b>	F: 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	58°C	239 pb
	R: 5'-GCCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC-3'	35 segundos	

**Tabla 4.1: Secuencias de primers utilizadas, temperaturas de annealing y longitud del producto. F: forward; R: reverse; pb: pares de bases.1**

La desnaturalización inicial de las amplificaciones fue a 94°C durante 5 minutos. Condiciones del ciclado: 94°C durante 2 segundos, annealing (ver tabla 4.1) y 72°C durante 30 segundos para la extensión (Rotor-Gene Q, QIAGEN). La cantidad de ciclos fue de 40 para todos los genes evaluados. El rango de temperaturas de melting evaluadas para los productos fue de 77°C-95°C, por 2 segundos.

Para obtener la eficiencia de reacción de cada gen se realizó una curva de calibrado con un pool de ADNc de las muestras de cada tejido. Para el gen de interés ECA y el de referencia GAPDH se partió de una dilución 1/40 y se hicieron 5

diluciones sucesivas al medio (1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280), para los genes de interés ECA2, AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub> se partió de una dilución 1/10 y se hicieron 5 diluciones sucesivas al medio (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320). Se le asignó a cada una de las diluciones una cantidad arbitraria de copias por reacción (1/10: 400; 1/20: 200; 1/40: 100; 1/80: 50; 1/160: 25; 1/320: 12,5; 1/640: 6,25; 1/1280: 3,125). Se comprobó que la diferencia de Ct entre diluciones era de 1. El control positivo provino de la dilución del pool correspondiente a la utilizada por las muestras. El control negativo consistió en la misma dilución de las muestras, pero de ARNm proveniente de las extracciones, sin realizarle la retrotranscripción a ADNc.

Se comprobó que la eficiencia de reacción entre genes era <5%. Los valores de Ct se interpolaron en las curvas correspondientes a cada gen, obteniéndose las copias por reacción de cada muestra. Los niveles de ARNm de interés fueron expresados como copias por reacción de cada muestra, normalizados por las copias por reacción correspondientes al gen de referencia (GAPDH). Todas las muestras se analizaron por triplicado<sup>338</sup>.

#### **4.8.3 Determinación de los niveles proteicos de ECA, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>**

Se determinaron los niveles proteicos de la ECA en riñones de las ratas de 6 días de vida, y de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en riñones de ratas de 6 días de vida y en corteza renal y ventrículo izquierdo de ratas de 81 días de vida mediante la técnica de Western Blot.

#### **Metodología**

Los tejidos extraídos fueron homogeneizados (homogeneizador Pro 200, Pro Scientific Inc., Oxford, CT, USA) en el buffer de lisis: 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 20% tritón; 4,2 mg/mL fluoruro de sodio; 44 mg/mL pirofosfato de sodio; 2 mM PMSF; 1,6 U aprotina; 10mM orto-vanadato de sodio. Posteriormente los homogenatos fueron centrifugados a 100.000 g durante 60 minutos a 4°C. Luego se midió la concentración de proteínas en los sobrenadantes mediante la técnica de Bradford<sup>339</sup>. Finalmente, las muestras se diluyeron en buffer Laemmli (50 mM Tris.HCl pH 6,8; 6 M urea; 6% β<sub>2</sub>-mercaptoetanol; 3% SDS; azul de bromofenol), se

calentaron a 100°C durante 2 minutos para ser sometidas a una separación en un gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para las determinaciones de AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> se sembraron 80µg proteínas/calle que fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 10% realizando una electroforesis a 100 mV durante una hora y media en una minicubeta (Bio-Rad). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando el sistema Miniprotean 3 (Bio-Rad) a 300 mA, a 4°C, durante 1 hora en frío y con buffer de transferencia (48 mM Tris pH 9,2; 39 mM glicina; 20% metanol). Para la determinación de ECA se sembraron 100 µg proteínas/calle que fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 7%. La electroforesis se realizó a 100 mV durante una hora y media aproximadamente en una minicubeta. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó durante una hora y media en frío y con buffer de transferencia con SDS al 0,03%. Se controló la transferencia de las proteínas mediante tinción con el colorante rojo de Ponceau S.

Posteriormente, se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% leche en polvo desnatada en buffer Tris (TBS)/Tween 20 0,1% con agitación suave. Luego se realizó la incubación con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C con agitación suave (ver tabla 4.2). Tras realizar 4 lavados de 10 minutos con TBS/Tween 20 0,1% a temperatura ambiente con agitación para eliminar el exceso de anticuerpo, éstos fueron detectados con el anticuerpo secundario, incubándolo durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación con suave (ver tabla 4.3). Luego se realizaron otros 4 lavados de 10 minutos con TBS/Tween 20 0,1% a temperatura ambiente con agitación.<sup>340</sup>

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Especie</b>	<b>Tipo de anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Incubación</b>
Anti ECA	Cabra	Policlonal	1:1000	Toda la noche a 4°C con agitación suave
Anti AT <sub>1</sub>	Conejo	Policlonal	1:1000	
Anti AT <sub>2</sub>	Conejo	Policlonal	1:800	
Anti actina	Conejo	Policlonal	1:2000	

**Tabla 4.2: Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de Western blot.** Todas las diluciones se prepararon en albúmina al 1% en TBS/Tween 20.

Anticuerpo secundario	Especie	Incubación previa	Dilución	Tiempo de incubación
Anti inmunoglobulinas de Conejo	Cabra	Anti Actina	1:4000	1 hora a temperatura ambiente con agitación
		Anti AT <sub>1</sub>	1:2000	
		Anti AT <sub>2</sub>	1:2000	
Anti inmunoglobulinas de Cabra	Burro	Anti ECA	1:5000	

**Tabla 4.3: Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de Western blot.** Todas las diluciones se prepararon en leche descremada al 1% en TBS/Tween 20.

Las muestras fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando el sistema de detección ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) durante 2-4 minutos. La cuantificación de las bandas fue realizada mediante un analizador de imágenes digitales, usando un scanner Hewlett-Packard y el software de análisis ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA). Los niveles proteicos de interés fueron expresados como la densidad óptica de cada banda normalizada por la densidad óptica correspondiente a la banda de  $\beta$ -actina corrida en el mismo gel. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### Cuantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en los homogenatos se midió mediante la técnica de Bradford. Es una técnica colorimétrica basada en el cambio de absorbancia, de 466 nm a 595 nm, de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G250. Para la curva de calibración se empleó como patrón estándar de seroalbúmina bovina (BSA) disuelta en el buffer de homogeneización de las muestras. En un tubo de reacción se mezclaron por inmersión 100  $\mu$ l de una dilución 1/20 para los riñones de ratas de 6 días de vida, y 1/40 de las muestras de corteza renal o ventrículo izquierdo de ratas de 81 días de vida. Para la construcción de la curva patrón se añadieron 100  $\mu$ l de agua destilada como blanco o 100  $\mu$ l de las diferentes diluciones de BSA (solución madre: 0,5 mg/ml, curva de calibración: 1/3, 1/5, 1/10, 1/20) con 90  $\mu$ l de agua destilada y 1000  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se realizó el cálculo de la concentración de proteínas interpolando en la curva <sup>339</sup>.

#### 4.8.4 Localización y niveles de AngII y de receptor AT<sub>1</sub> por Inmunohistoquímica

##### Fundamento

Se determinó la inmunomarcación de AngII y AT<sub>1</sub> en la corteza renal de ratas de 6 y 81 días de vida, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se midió la densidad de los receptores AT<sub>1</sub> en aorta a los 81 días de vida.

##### Metodología

Una porción de tejido renal o de aorta torácica fue fijada en formaldehído 10% p/v en buffer fosfato de sodio (PBS), pH 7,4 e incluida en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 4µm de espesor y se desparafinizaron empleando xileno y, a continuación, se hidrataron con soluciones de etanol de graduación decreciente y, finalmente, solución buffer PBS, pH 7,4. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó mediante la incubación de las secciones durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno 1% p/v en metanol. Después de realizar 3 lavados de 5 minutos en PBS, pH 7,4; los cortes fueron incubados con suero de bloqueo durante 20 minutos. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-AT<sub>1</sub> (dilución 1/100; Millipore) o con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-AngII (dilución 1/100; Peninsula Laboratories LLC), durante toda la noche a 4°C. La inmunomarcación de las secciones de tejido se reveló mediante el empleo del kit comercial Vectastain ABC (Universal Elite, Vector Laboratories, CA, USA) que incluye anticuerpos secundarios universales biotinilados y el reactivo avidina-peroxidasa. Se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos. Después de realizar 3 lavados en PBS durante 5 minutos cada uno, se incubaron durante 40 minutos con el reactivo Vectastain Elite ABC, y se expusieron durante 5 minutos a diaminobenzidina 0,1% y peróxido de hidrogeno 0,2% en solución buffer Tris 50 mM, pH 8. La contra-tinción se realizó con hematoxilina de Mayer y los preparados se montaron con bálsamo de Canadá.<sup>341</sup>.

Los controles negativos se realizaron con secciones de tejido incubadas con PBS en lugar del anticuerpo primario.

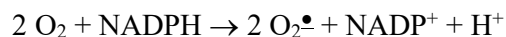
Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Qcolor 3, Olympus America Inc., Richmond Hill,

Ontario, Canadá). Se tomaron 20 fotografías consecutivas y se midió en área inmunoreactiva utilizando el software Image-Pro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD). Las mediciones se realizaron a doble ciego y bajo similares condiciones de luz, ganancia, compensación y magnificación. Se informan los % de área teñida en relación al área total de tejido.

#### **4.9 Determinación de la producción de anión superóxido inducida por NADPH en ventrículo izquierdo**

##### **Fundamento**

Se determinó la producción de anión superóxido inducida por NADPH, estimando así la actividad de la enzima NADPH oxidasa, en ventrículo izquierdo. La enzima NADPH oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O<sub>2</sub> con la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, de acuerdo con la reacción:



El agregado del sustrato NADPH al medio de reacción induce la actividad de la enzima, que se evaluó mediante el monitoreo de la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> determinado a través de la quimioluminiscencia de la lucigenina. La lucigenina, en una reacción de adición con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, se transforma en un compuesto inestable (lucigenina dioxietano) que se descompone en dos acridonas. Una de las acridonas generadas se encuentra en estado excitado, y vuelve a su estado fundamental produciendo luz <sup>342</sup>.

##### **Metodología**

La producción de anión superóxido dependiente NADPH oxidasa en el ventrículo izquierdo se midió por el método de lucigenina. Cortes de ventrículo izquierdo de 1x 5 mm fueron incubados en 3 mL de buffer de reacción por 20 minutos, gasificado con carbógeno (95% O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>) a 37°C. El buffer consistió en buffer Krebs con la siguiente composición: 118,3 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,35 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 11 mM glucosa; 20 mM Hepes (pH 7.4 después de aireación con carbógeno). Cada corte se colocó en un vial de centelleo con 5 μmol/L lucigenina en un volumen final de 1 mL de Krebs-HEPES a

37°C. La quimioluminiscencia emitida (basal) fue medida en contador de centelleo líquido (LKB Wallac 1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Finlandia). Luego, se añadieron 5 mmol/L NADPH y la quimiluminiscencia emitida se midió cada 15 segundos, por 5 minutos. Para evaluar la especificidad del método, se incubaron cortes con tempol, un mimético de la SOD (1 mM) en un volumen final de 3 mL de buffer de reacción, por 20 minutos con carbógeno, a 37°C. Las mediciones se realizaron en presencia de tempol (1 mM) en un volumen final de 1 mL. La incubación con tempol redujo la señal de la luminiscencia estimulada por NADPH a niveles basales en todos los grupos. Los datos se corrigieron con el valor basal y se calculó el área bajo la curva. Los resultados se normalizaron con el peso del tejido seco y se compararon con el valor del control <sup>343</sup>.

#### **4.10 Evaluación de la respuesta contráctil de la aorta torácica frente a la AngII**

Se estudió de reactividad vascular en anillos de aorta torácica de animales adultos de ambos sexos. Se determinó la respuesta contráctil vascular mediante el agregado de concentraciones crecientes de AngII ( $10^{-10}$  M a  $10^{-6}$  M) al baño de reacción.

##### **Metodología**

Las ratas de 81 días fueron sacrificadas por decapitación y se extrajo rápidamente la porción descendente de la arteria aorta torácica. Ésta se colocó en solución Krebs fría, se removió cuidadosamente el tejido conectivo y el tejido adiposo perivascular y se obtuvieron anillos de 3 a 4 mm de espesor para realizar los estudios de reactividad vascular.

Los segmentos obtenidos de arteria aorta se suspendieron en solución Krebs de pH 7,4, gasificada con 95 % de O<sub>2</sub>-5 % de CO<sub>2</sub> a  $37 \pm 0,5$  °C, utilizando un sistema de baño de órgano aislado en donde los anillos son estabilizados durante 60 minutos ajustando a una tensión basal de 1 g entre un soporte fijo y otro móvil que se encontraba conectado a un transductor de fuerza (TRI201, rango  $\pm 25$  g, PanLab SL) y las mediciones fueron registradas con un polígrafo (Fisiógrafo modular Power Lab, ADInstruments). Los datos obtenidos se procesaron con un programa de adquisición de datos (PowerLab 8/30 and Labchart, Australia). Durante este período de



estabilización, la solución Krebs se renovó cada 15 minutos y, en caso de ser necesario, la tensión se reajustó a 1 g. La composición de la solución Krebs fue: 118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,55 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,15 mM MgCl<sub>2</sub>; 11,1 mM D-glucosa; 0,004 mM EDTA; 0,11 mM ácido ascórbico.

Al finalizar el período de estabilización, se evaluó la capacidad de contracción del músculo liso vascular cambiando la solución Krebs por una solución Krebs enriquecida en potasio de pH 7,4, cuya composición fue: 32,8 mM NaCl; 90 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,55 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,15 mM MgCl<sub>2</sub>; 11,1 mM D-glucosa; 0,004 mM EDTA; 0,11 mM ácido ascórbico. Posteriormente, se lavaron los anillos hasta alcanzar nuevamente la tensión basal de 1 g con solución Krebs y se evaluó la integridad del endotelio agregando acetilcolina (ACh, agonista de los receptores colinérgicos muscarínicos, 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M) en anillos pre-contraídos con fenilefrina (FE, agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α<sub>1</sub>, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M). Se descartaron los anillos con una respuesta máxima a ACh menor al 60 %. Nuevamente se realizaron lavados con solución Krebs hasta alcanzar la tensión basal de 1 g para los estudios de relajación o constricción <sup>344</sup>.

Luego de este período se evaluó la respuesta contráctil frente al agregado de concentraciones crecientes de AngII (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M). La respuesta vasoconstrictora se expresó como la tensión obtenida luego del agregado de AngII, respecto a la tensión máxima alcanzada con Krebs enriquecido en potasio (90 mM KCl), en porcentaje.

Se graficaron las curvas concentración-respuesta a AngII. Las curvas fueron analizadas mediante regresión no lineal y ajustadas a una curva sigmoidea con pendiente variable utilizando un software estadístico (Graph Pad Prism 5.0, San Diego, CA). Se obtuvo el valor de respuesta máxima (R<sub>máx</sub>, máxima amplitud alcanzada en las curvas de concentración-respuesta) y pCE<sub>50</sub> (-log CE<sub>50</sub>, donde CE<sub>50</sub> fue la concentración molar requerida para alcanzar el 50 % de la respuesta máxima).

## PROTOCOLO II

### 4.11 Animales

El estudio se llevó a cabo en ratas Wistar machos exocriadas, tal como se describió en la sección 3.1.

### 4.12 Preparación e implantación de las bombas osmóticas subcutáneas

La infusión crónica de AngII (AII) o solución fisiológica (SF, vehículo) en los animales se realizó mediante la colocación de bombas osmóticas subcutáneas (Alzet mini-osmotic pumps modelo 2002, Alza; Palo Alto, CA). Este modelo de bombas osmóticas se eligió debido a que liberan una solución de manera continua por 14 días sin necesidad de colocar conectores externos o realizar manipulación frecuente de los animales, asegurando una liberación estable de la solución elegida a temperaturas corporales de 37°C.

El procedimiento de llenado de las bombas osmóticas se realizó bajo flujo laminar para mantener la esterilidad de los materiales. Cada bomba se llenó con 200 µl de solución de interés a temperatura ambiente, procurando que el llenado sea completo y que no contenga burbujas. De este modo, se asegura que las bombas osmóticas liberen 65ng/min de AII o SF.

Luego se procedió a la implantación de las bombas de manera subcutánea, mediante la siguiente técnica quirúrgica. En el animal anestesiado se realizó una pequeña incisión en la piel que se encuentra entre las escápulas, abriendo el espacio hasta que se forma un pequeño bolsillo. La bomba osmótica se insertó en el bolsillo con el moderador de flujo alejado de la zona de la incisión. Luego se procedió al cierre de la incisión mediante sutura de la piel. Todo el procedimiento se realizó con instrumentos quirúrgicos y guantes estériles.

Un grupo de animales Ccm, Bbm y Bcm recibió una infusión subcutánea de AII (65 ng/min, diluida en SF), mientras que otro grupo de animales Ccm, Bbm y Bcm recibió una infusión de NaCl 0,9 % (SF) con el mismo flujo. Las bombas osmóticas fueron implantadas 14 días antes de finalizar el período experimental (día 68) <sup>345</sup>

### 4.13 Registro de la presión arterial sistólica

Se determinó la presión arterial sistólica de forma indirecta cada 3 días con el método de “tail cuff” (ADInstruments Quad Bridge Amp y los softwares ADInstruments PowerLab 8/30 y Labchart, Australia) detallada en la **sección 4.6**.

### 4.14 Evaluación de la morfología vascular

Al finalizar el período experimental, los animales fueron sacrificados por decapitación. Ambos riñones, la arteria aorta torácica y el corazón fueron extraídos inmediatamente del animal para realizar las técnicas histológicas.

El estudio de los preparados histológicos se realizó con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Qcolor 3, Olympus America Inc., Richmond Hill, Ontario, Canadá). Las imágenes se analizaron con el software Image-Pro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD). Las mediciones se realizaron a doble ciego y bajo similares condiciones de luz, ganancia, compensación, y magnificación.

#### 4.14.1 Determinación de los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno perivasculares de las arterias renales corticales

##### Fundamento y Metodología

Se realizó la tinción de Sirius Red como se detalló en la **sección 4.7.2**.

En cortes longitudinales de riñón se identificaron arterias renales de resistencia (arcuatas e interlobulillares). Las arterias arcuatas fueron identificadas a lo largo de la unión corticomédular y rodeadas de túbulo. Las arterias interlobulillares fueron identificadas como una sola arteria muscular dentro de la corteza interna y, a veces, situada cerca del glomérulo. Se excluyeron del estudio las arterias que no estaban seccionadas transversalmente y aquellas cuya área total del vaso (ATV) no se encontraba dentro de un rango de 600-2500  $\mu\text{m}^2$ .

Se analizaron 30 vasos de tejido renal por preparado, con una magnificación x400. Para cada arteria se midió el ATV, el área total de la arteria incluyendo el colágeno perivascular de la adventicia (ATVC) y el área de la luz (AL). El área de la pared vascular (AM) fue calculada como  $AM=ATV-AL$ . Para evaluar la existencia de remodelado en la pared arterial, se calcularon las relaciones  $AM/AL$  y  $AL/ATV$ , expresada como  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . Para cuantificar los depósitos de colágeno perivascuales, el área del colágeno (AC) fue estimado por la diferencia entre ATVC y ATV, y normalizado por AL. La relación  $AC/AL$  fue expresada  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2 \times 10^{346}$ .

#### **4.14.2 Determinación de los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno perivascuales de las arterias coronarias del ventrículo izquierdo**

##### **Fundamento y Metodología**

La metodología de Sirius Red se desarrolló en la **sección 4.7.2**. Esta técnica permite visualizar en color rojo las fibras de colágeno presentes en la capa muscular (colágeno intersticial de la túnica media) y en la adventicia (colágeno perivascular).

Se analizaron 30 vasos de tejido cardíaco por preparado, con una magnificación x400. Para cada arteria se midió el área total vascular (ATV), el área total de la arteria incluyendo el colágeno perivascular de la adventicia (ATVC) y el área de la luz del vaso (AL). El AM fue calculada como  $AM=ATV-AL$ . Para evaluar la existencia de remodelado en la pared arterial, se calcularon las relaciones  $AM/AL$  y  $AL/ATV$ , expresada como  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ . Para cuantificar los depósitos de colágeno perivascuales, el AC fue estimada por la diferencia entre ATVC y ATV, y normalizada por AL. La relación  $AC/AL$  fue expresada  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2 \times 10^{346}$ . Se excluyeron del estudio las arterias que no estaban seccionadas transversalmente. Se midieron arterias cuya ATV se encontraba dentro del rango de 500-3000  $\mu\text{m}^2$

#### **4.14.3 Determinación de los parámetros morfométricos y los depósitos de colágeno perivascuales de la aorta torácica**

##### **Fundamento y Metodología**

La metodología de Sirius Red se desarrolló en la **sección 4.7.2.**

En preparados de aorta torácica de ratas de 81 días teñidos con Sirius Red se determinó el área de colágeno perivascular normalizada por el área de la luz del vaso (AC/AL) y el área de la pared media normalizada por la luz del vaso (AM/AL). Para estas determinaciones se utilizó un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Qcolor 3, Olympus America Inc., Richmond Hill, Ontario, Canadá). Las imágenes se analizaron utilizando el software Image-Pro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD). Las mediciones se realizaron a doble ciego y bajo similares condiciones de luz, ganancia, compensación y magnificación.

#### **4.15 Evaluación de marcadores proinflamatorios (IL-6 y TNF- $\alpha$ )**

Las determinaciones de estos marcadores fueron realizadas en el laboratorio de Medicina Experimental del Hospital Alemán por el Dr. Jorge Tobli

#### **Fundamento**

La IL-6 y el TNF- $\alpha$ , son citoquinas pro-inflamatorias que poseen un rol central en los mecanismos etiopatogénicos de varias patologías de origen inmunológico o inflamatorio<sup>347</sup>. Se determinó la inmunomarcación de IL-6 y TNF- $\alpha$ , mediante la técnica de inmunohistoquímica en corteza renal, ventrículo izquierdo y aorta.

#### **Metodología**

Una porción de tejido fue fijada en formaldehído 10% p/v en buffer fosfato de sodio, pH 7,4, e incluida en parafina. Se realizaron cortes de 4 $\mu$ m de espesor y se desparafinizaron empleando xileno y, a continuación, se hidrataron con soluciones de etanol de graduación decreciente y, finalmente, solución buffer PBS, pH 7,4.

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó mediante la incubación de las secciones durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno 1% p/v en metanol. Después de lavar en PBS, pH 7,4, durante 20 minutos, los cortes incubaron con suero de bloqueo durante 20 minutos. Posteriormente, las secciones se incubaron con el

anticuerpo primario policlonal de cabra anti-IL-6 (dilución 1/100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o con el anticuerpo primario monoclonal anti-TNF- $\alpha$  (dilución 1/50; R&D Systems, Minneapolis, MN), durante toda la noche a 4°C. La inmunomarcación de las secciones de tejido se reveló mediante el empleo del kit comercial Vectastain ABC (Universal Elite, Vector Laboratories, CA, USA) que incluye anticuerpos secundarios universales biotinilados y el reactivo avidina-peroxidasa. Se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos. Después de lavar en PBS, se incubaron durante 40 minutos con el reactivo Vectastain Elite ABC, y se expusieron durante 5 minutos a diaminobenzidina 0,1% y peróxido de hidrogeno 0,2% en solución buffer Tris 50 mM, pH 8. La contra-tinción se realizó con hematoxilina de Mayer y los preparados se montaron con bálsamo de Canadá.

Los controles negativos se realizaron con secciones de tejido incubadas con PBS en lugar del anticuerpo primario.

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Qcolor 3, Olympus America Inc., Richmond Hill, Ontario, Canadá). Se tomaron 20 fotografías consecutivas y se midió en área inmunoreactiva utilizando con el software Image-Pro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD). Las mediciones se realizaron a doble ciego y bajo similares condiciones de luz, ganancia, compensación y magnificación. Se informan los % de área teñida en relación con el área total de tejido.

#### 4.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para comprobar la distribución normal de las variables y el test de Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. En los casos de distribución normal y varianzas homogéneas, los valores fueron expresados como la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media) y fueron analizados utilizando el test-t de Student o el ANOVA (análisis de la varianza).

Para el análisis estadístico de variables de distribución normal con sólo dos grupos experimentales a comparar, se utilizó el test-t de Student.

En los casos de variables de distribución normal con más de dos grupos experimentales, se utilizó el ANOVA. En los casos donde un factor era la dieta y el otro, el sexo, el tiempo o el tratamiento, se realizó el ANOVA de 2 factores. Los efectos de un factor fueron analizados independientemente de los efectos del otro. En el caso de no haber interacción significativa dieta x sexo/tiempo, se realizó un ANOVA de 2 factores seguido del test *a posteriori* de Bonferroni para comparaciones múltiples considerando los efectos principales. Cuando la interacción dieta x sexo/tiempo/tratamiento fue significativa, se analizaron los efectos simples con el test *a posteriori* de Bonferroni para múltiples comparaciones entre los grupos de interés.

En todos los casos se indicó el tamaño muestral (n) y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como diferencia significativa. El Software Prism (Graph Pad Software, Inc, San Diego CA, EE. UU.) fue utilizado para el análisis estadístico.

## 4.17 Reactivos

Nombre	Origen
Aceite de maíz	Mazola, Argentina
Acetilcolina clorhidrato	Sigma-Aldrich, EEUU
Acetonitrilo	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-etan-sulfónico (HEPES)	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro benzoico (DTNB)	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido acético	Biopack, Argentina
Ácido ascórbico	Biopack, Argentina
Ácido clorhídrico	Anedra, Argentina
Ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido etilen-glicol-tetraacético (EGTA)	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido fólico	Anedra, Argentina
Acido nicotínico	Fluka, Suiza
Ácido nítrico	Biopack, Argentina
Ácido ortofosfórico	Merck, Argentina
Ácido pícrico	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido tiobarbitúrico	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido tricloroacético	Sigma-Aldrich, EEUU
Ácido trifluoroacético	Merck, Argentina
Agua libre de nucleasas	Biodynamics, Argentina
Agua Milli-Q	Merck, Argentina
Agua tratada DEPC libre de DNAsas y ARNasas	Invitrogen, EEUU
Albúmina sérica bovina	ICN, EEUU



<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
Angiotensina II (AngII)	Sigma-Aldrich, EEUU
Angiotensina-(1-7) Ang-(1-7)	Bachem, EEUU
Anticuerpo monoclonal de conejo anti- $\beta$ -actina	Sigma-Aldrich, EEUU
Anticuerpo monoclonal de conejo anti-TNF- $\alpha$	R&D Systems, EEUU
Anticuerpo policlonal de cabra anti-ECA (ECA)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
Anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-6	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
Anticuerpo policlonal de conejo anti-AT <sub>2</sub> (AT <sub>2</sub> )	Millipore, EEUU
Anticuerpo policlonal de conejo anti-AngII (ECA)	Peninsula Laboratories LLC, EEUU
Anticuerpo policlonal de conejo anti-Ang-(1-7)	Bachem, EEUU
Anticuerpo policlonal de conejo anti-AT <sub>1</sub> (AT <sub>1</sub> )	Millipore, EEUU
Anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo	Vector laboratories, EEUU
Anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano	Bio-Rad, EEUU
Anticuerpo secundario de burro anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
Aprotinina	Sigma-Aldrich, EEUU
Azida sódico	Anedra, Argentina
Bálsamo de Canadá	Merck, Argentina
Bicarbonato de sodio	Anedra, Argentina
Biotina	Sigma-Aldrich, EEUU
Butilhidroxitolueno (BHT)	Sigma-Aldrich, EEUU
Cafeína	Biopack, Argentina
Calmidazolium	Sigma-Aldrich, EEUU

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
Carbonato de calcio precipitado	Biopack, Argentina
Caseinato de calcio	COFEM, Argentina
Citrato de hierro y amonio	Sigma-Aldrich, EEUU
Cloruro de calcio dihidrato	Anedra, Argentina
Cloruro de colina	Anedra, Argentina
Cloruro de magnesio hexahidrato	Cicarelli, Argentina
Cloruro de potasio	Cicarelli, Argentina
Cloruro de sodio	Biopack, Argentina
Cloruro de zinc	Biopack, Argentina
Cloruro férrico	Anedra, Argentina
Cloruro férrico	Biopack, Argentina
Cocktail de inhibidores de proteasas	Thermo Scientific, EEUU
Coomassie Brilliant Blue G250, solución ácida	Bio Rad Laboratories, Inc., EEUU
D-glucosa	Biopack, Argentina
Diaminobenzidina	Polyscience, EEUU
Ditiotreitol	Bio Rad Laboratories, Inc., EEUU
dNTPs Mix, 10 mM each	Thermo Scientific, EEUU
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Bio-Rad, Munchen, Alemania
Eosina	Merck, Argentina
Epinefrina	Sigma-Aldrich, EEUU
Etanol Absoluto	Biopack, Argentina
Éter etílico	Dorwil, Argentina

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
Fenilefrina	Sigma-Aldrich, EEUU
Formaldehído	Biopack, Argentina
Fosfato dibásico de potasio	Biopack, Argentina
Fosfato dibásico de sodio	Biopack, Argentina
Fosfato monobásico de potasio	Biopack, Argentina
Fosfato monobásico de sodio monohidrato	Biopack, Argentina
Fluoruro de sodio	J.T Baker, EEUU
Fucsina ácida	Sigma-Aldrich, EEUU
Glicina	Bio Rad Laboratories, Inc., EEUU
Hematoxilina	Sigma-Aldrich, EEUU
Hidróxido de sodio	Anedra, Argentina
Inhibidor de renina	AnaSpeck Inc, EEUU
Ioduro de potasio	Anedra, Argentina
Kit comercial Dead End T, Colorimetric System	Promega, EEUU
kit comercial Vecstastain Elite ABC (Universal)	Vector Laboratories, EEUU
Leche en polvo desnatada	Nestlé, Argentina
Maltodextrina	FOOD S.A., Argentina
Marcador de peso molecular Full Range Rainbow	Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare Life Sciences, Suecia
Membrana de nitrocelulosa, Hybond ECL0,45µm	Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare Life Sciences, Suecia
Metanol	Biopack, Argentina

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
Mezcla Real 2x para Real-Time PCR, 100rxn	Biodynamics, Argentina
Molibdato de amonio tetrahidrato	Anedra, Argentina
N,N'-Dimetil-9,9'-biacridinio dinitrato (lucigenina)	Sigma-Aldrich, EEUU
n-Hexano	Biopack, Argentina
Nitroprusiato de sódio	Anedra, Argentina
o-fenantrolina	Sigma-Aldrich, EEUU
Oil red O	Sigma-Aldrich, EEUU
Oligo(dT)18 primer (0,5µg/µl)	Thermo Scientific, EEUU
Orto-vanadato de sodio	Sigma-Aldrich, EEUU
Pantotenato de calcio	Anedra, Argentina
Parafina	Biopack, Argentina
Paraformaldehído	Sigma-Aldrich, EEUU
Para-Cloromercuribenzoato	Sigma-Aldrich, EEUU
Peróxido de hidrógeno	Cicarelli, Argentina
Persulfato de amonio (PMSF)	Sigma-Aldrich, EEUU
Piridoxina HCl	Sigma-Aldrich, EEUU
Pirofosfato de sodio	Anedra, Argentina
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich, EEUU
Primers Forward, Reverse	IDT, EEUU
Propilenglicol	Biopack, Argentina
Reactivo bloqueante de peroxidasa	DakiCytomation, Canadá

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/μl)	ThermoFisher Scientific, EEUU
RiboLock RNase Inhibitor (40u/μl)	Thermo Scientific, EEUU
Riboflavina	Sigma-Aldrich, EEUU
RNAlater RNA stabilization reagent	QIAGEN, EEUU
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, EEUU
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	QIAGEN, EEUU
RNeasy Tissue Mini Kit	QIAGEN, EEUU
Rojo de Ponceau S	Sigma-Aldrich, EEUU
Sacarosa	Biopack, Argentina
SDS - PAGE	Bio-Rad, Alemania
Selenato de sodio anhidro	Sigma-Aldrich, EEUU
Sistema de detección Amersham ELC de Western Blotting Detection Reagent	Amersham Pharmacia Biotech, Suecia
Streptavidina-Peroxidasa de rábano	Vector laboratories, EEUU
Suero de cabra anti-IgG de conejo	Invitrogen, EEUU
Sulfato de cobre pentahidrato	Anedra, Argentina
Sulfato de magnesio heptahidrato	Biopack, Argentina
Sulfato de manganeso monohidrato	Cicarelli, Arentina
Superóxido dismutase	Sigma-Aldrich, EEUU
Terbutilhidroperóxido	Fluka, Suiza
Tetrahidrofurano	Biopack, Argentina
Tiamina HCl	Sigma-Aldrich, EEUU
Tris Ultra Pure™	Invitrogen, EEUU
Triton X-100	Sigma-Aldrich, EEUU

<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>
Tween 20	Sigma-Aldrich, EEUU
Vitamina A palmitato, 1.700.000 IU/g	Parafarm, Argentina
Vitamina B12	Sigma-Aldrich, EEUU
Vitamina D3, colecalciferol 40.000.000 U/g	Sigma-Aldrich, EEUU
Vitamina E, alfa-tocoferol	Sigma-Aldrich, EEUU
Vitamina K, menediona	Sigma-Aldrich, EEUU
Xileno	Cicarelli, Argentina
$\beta$ -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich, EEUU
$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido ( $\beta$ -NADPH)	Sigma-Aldrich, EEUU

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 RESULTADOS: PROTOCOLO I

### Efectos de la deficiencia de zinc durante el desarrollo fetal, la lactancia y/o la adultez sobre el crecimiento, la presión arterial y el sistema renina angiotensina renal y cardiovascular.

#### 5.1.1 Registro del peso corporal, del consumo de alimento y de la concentración de zinc sérica de las ratas madres durante la gestación y la lactancia

Como se observa en la **tabla 5.1**, los pesos corporales de las madres que recibieron dieta control (MC) o dieta baja en zinc (MB) fueron similares al inicio del apareo, al día 21 de gestación y al día 21 de lactancia (destete de sus crías).

	MC	MB
<b>Peso corporal al inicio del apareo (g)</b>	253 ± 4	267 ± 4
<b>Peso corporal al 21 día de gestación (g)</b>	339 ± 5	346 ± 10
<b>Peso corporal al día del destete de las crías (g)</b>	275 ± 9	257 ± 15

**Tabla 5.1. Peso corporal de las ratas madres en diferentes momentos del período experimental.** Los valores se expresan como la media ± EEM y fueron analizados con el test-t de Student; n=10 por grupo.

La **tabla 5.2** muestra el consumo de alimento durante la preñez y la lactancia de las ratas madres y la concentración sérica de zinc. El consumo de alimento en ambos periodos (preñez y lactancia) fue similar entre los grupos MC y MB, por lo tanto no fue necesario introducir un grupo experimental pareado (madres que reciben igual cantidad de dieta control que el que consumieron las madres con dieta baja en zinc). Las madres que fueron alimentadas con una dieta deficiente en zinc durante la gestación y la lactancia presentaron una menor concentración de zinc sérica respecto a las madres controles (**tabla 5.2**).



	MC	MB
<b>IDP durante la preñez (g/día)</b>	22 ± 2	19 ± 2
<b>IDP durante la lactancia (g/día)</b>	43 ± 9	40 ± 2
<b>Concentración sérica de zinc al día del destete (µg/dl)</b>	73 ± 7	35 ± 7*

**Tabla 5.2. Consumo de alimento y concentración sérica de zinc en ratas madres.**

IDP: ingesta diaria promedio de alimento durante el período indicado. Los valores son expresados como la media ± EEM, fueron analizados con el test-t de Student; n=10 por grupo. \*p<0,001 vs MC.

### 5.1.2 Registro del peso corporal, la longitud de la tibia y la concentración sérica de zinc en crías de 6 días de vida.

Las crías nacidas de madres alimentadas con la dieta baja en zinc durante los periodos de gestación y lactancia presentaron menores pesos corporales a los 6 días de vida respecto a aquellas crías nacidas de madres controles. No se observaron diferencias significativas en la longitud de la tibia. La restricción dietaria de zinc en las madres tuvo como consecuencia una reducción en la concentración de zinc sérica de las crías Bm y Bh (tabla 5.3).

	Cm	Bm	Ch	Bh
<b>Peso corporal (g)</b>	13,2 ± 0,1	12,1 ± 0,2*	12,5 ± 0,2	11,1 ± 0,2 <sup>δ</sup>
<b>Longitud de tibia (mm)</b>	8,88 ± 0,05	8,91 ± 0,09	8,87 ± 0,05	8,75 ± 0,07
<b>Concentración sérica de zinc (µg/dl)</b>	173 ± 5	103 ± 7*	131 ± 7	89 ± 9 <sup>δ</sup>

**Tabla 5.3. Peso corporal, longitud de la tibia y concentración sérica de zinc en ratas de 6 días de vida.**

Los valores son expresados como la media ± EEM y fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples. n=12 por grupo. \*p<0,01 vs Cm; <sup>δ</sup>p<0,01 vs Ch.

### 5.1.3 Evaluación de la morfología renal a los 6 días de vida

Con el fin de determinar si la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y el crecimiento temprano induce alteraciones en la estructura renal, se estudió la histología de este tejido. Dado que la nefrogénesis comienza el día 12 del desarrollo embrionario y se completa a los 10-12 días de vida, se realizaron los estudios a los 6 días de vida. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 5.4**.

	<b>Cm</b>	<b>Bm</b>	<b>Ch</b>	<b>Bh</b>
<b>PR/PC (g/100 g)</b>	0,60 ± 0,01	0,55 ± 0,01*	0,63±0,01	0,59±0,01 <sup>δ</sup>
<b>Área total glomerular (µm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Área cortical</b>	2811±149	2258±81*	2337±108*	2108±175
<b>Área yuxtamedular</b>	4419±269	3596±149*	3120±110*	3159±138
<b>Área capilar glomerular (µm<sup>2</sup>)</b>				
<b>Área cortical</b>	2141±145	1818±67*	1855±90*	1691±55
<b>Área yuxtamedular</b>	2986±163	2774±99	2535±94*	2468±109
<b>TUNEL</b>				
<b>Número de células positivas por área cortical</b>	94 ± 9	248 ± 25*	39 ± 8*	54 ± 6 <sup>º</sup>

**Tabla 5.4. Peso de los riñones, áreas glomerulares y capilares, apoptosis medida por la técnica de TUNEL.** PR: peso del riñón, PC: peso corporal. Los valores son expresados como la media ± EEM y fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples. n=6 por grupo. \*p<0,01 vs Cm; <sup>δ</sup>p<0,01 vs Ch; <sup>º</sup>p<0,01 vs Bm.

Las crías deficientes en zinc de ambos sexos tuvieron un menor peso renal respecto de las crías controles. En cuanto al área total glomerular, tanto cortical como yuxtamedular, fue menor en las crías machos deficientes en zinc respecto a su control. Las crías hembras controles presentaron menores áreas glomerulares comparadas con los machos controles, pero los grupos con restricción de zinc no mostraron alteraciones

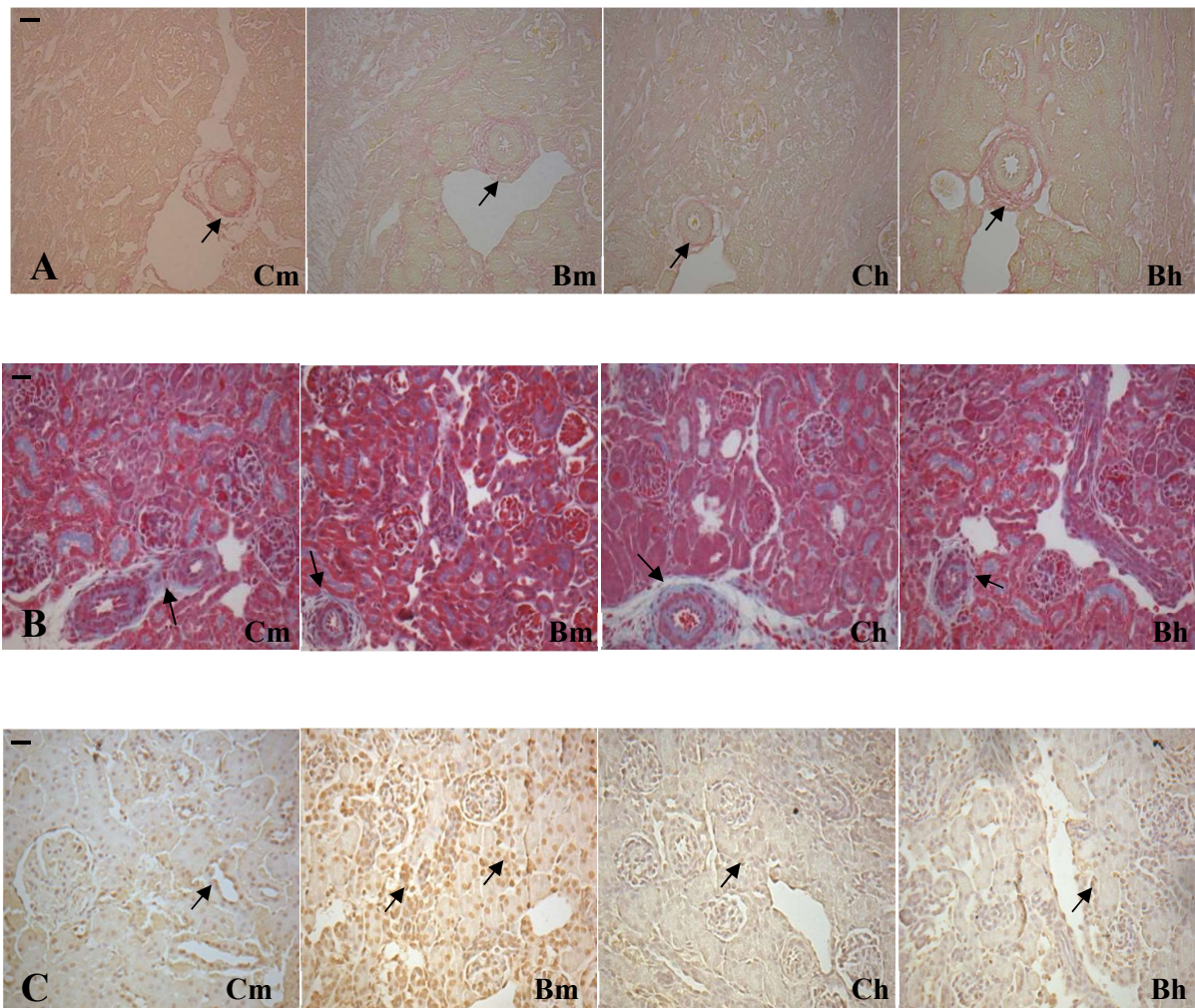
en estas estructuras renales. Esta es una evidencia de la diferencia de sexos ante esta deficiencia (**tabla 5.4**).

En cuanto al área capilar glomerular se observó que los machos deficientes tuvieron menor área capilar en la zona cortical en relación a los controles, pero esta diferencia no se encontró en la zona yuxtamedular. Las hembras controles también presentaron menor área capilar glomerular que los machos controles en ambas zonas evaluadas (**tabla 5.4**).

Con el fin de evaluar uno de los posibles mecanismos involucrados en las alteraciones estructurales renales inducidas por la deficiencia de zinc durante la gestación y la vida temprana, se determinó el número de células apoptóticas por área de corteza renal mediante la técnica de TUNEL. Las crías machos deficientes en zinc tuvieron un elevado número de células apoptóticas en el área cortical renal en comparación con los controles. La deficiencia de zinc no indujo cambios en la apoptosis entre las crías hembras que, a su vez, presentaron un menor número de células apoptóticas en comparación con los machos (**tabla 5.4**).

Se evaluaron los depósitos de colágeno en glomérulos, túbulos e intersticio peritubular de la corteza renal en cortes histológicos teñidos mediante la técnica de Sirius Red. Esta técnica permite visualizar el colágeno tipo I y III en color rojo. Los depósitos de colágeno fueron similares en todos los grupos estudiados (score: Cm:  $0,10 \pm 0,01$ ; Bm:  $0,14 \pm 0,08$ ; Ch:  $0,50 \pm 0,35$ ; Bh:  $0,54 \pm 0,25$ ; n=6 por grupo). Estos resultados fueron confirmados mediante la tinción con Tricrómico de Masson, técnica que tiñe el colágeno tipo I de color azul (score: Cm:  $0,2 \pm 0,1$ ; Bm:  $0,2 \pm 0,1$ ; Ch:  $0,1 \pm 0,1$ ; Bh:  $0,1 \pm 0,1$ ; n=6 por grupo).

En la **figura 5.1**. se observan fotografías representativas de la zona cortical del riñón teñidas con Sirius Red o Tricrómico de Masson, o con la técnica de TUNEL.



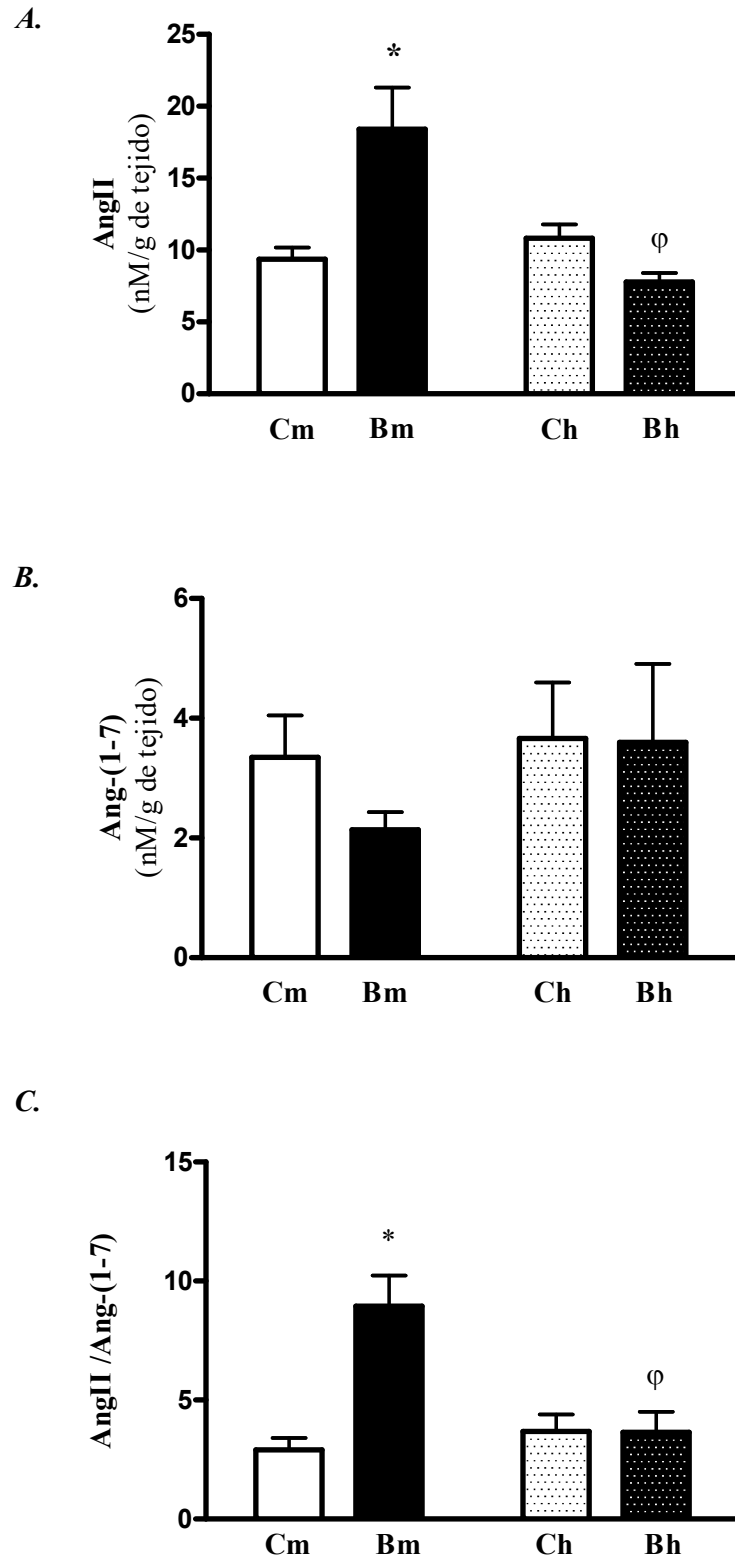
**Figura 5.1. Fotografías representativas de riñones de ratas de 6 días.** **A.** Tinción de Sirius red. La tinción de Sirius red permite visualizar el colágeno en color rojo. La flecha señala los depósitos de colágeno de la adventicia de las arterias renales corticales. **B.** Tinción con Tricrómico de Masson, en color azul, se visualiza el colágeno. **C.** TUNEL. Los núcleos apoptóticos se visualizan en color marrón. Las imágenes se muestran con una magnificación de x400. Barra de escala = 50  $\mu$ m. n=6 por grupo.

#### **5.1.4 Estudio de la participación del SRA renal a los 6 días de vida en las ratas expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y la vida postnatal temprana**

Dados los resultados en el tejido renal presentados de las ratas a los 6 días de vida y teniendo en cuenta el importante papel que ejerce el SRA sobre el desarrollo y función del riñón durante las etapas tempranas de la vida de la rata, se estudiaron los componentes del SRA renal.

##### **Contenido de AngII y de Ang-(1-7)**

La **figura 5.2.A.** muestra el contenido de AngII en tejido renal de las crías de 6 días de vida medidos por la técnica de RIA. Las crías macho que tuvieron una deficiencia dietaria de zinc durante la gestación y hasta los 6 días post-nacimiento presentaron niveles aumentados de AngII respecto a las crías controles. Sin embargo, la restricción de zinc no indujo cambios en los niveles de AngII en las ratas hembras. En cuanto al contenido renal de Ang-(1-7), no se hallaron diferencias entre los grupos machos y hembras sometidos a la restricción de zinc con respecto a los controles (**figura 5.2.B.**). En la **figura 5.2.C.** se observa que solo en el grupo de machos la relación AngII/Ang-(1-7) fue mayor en el grupo Bm respecto del control.

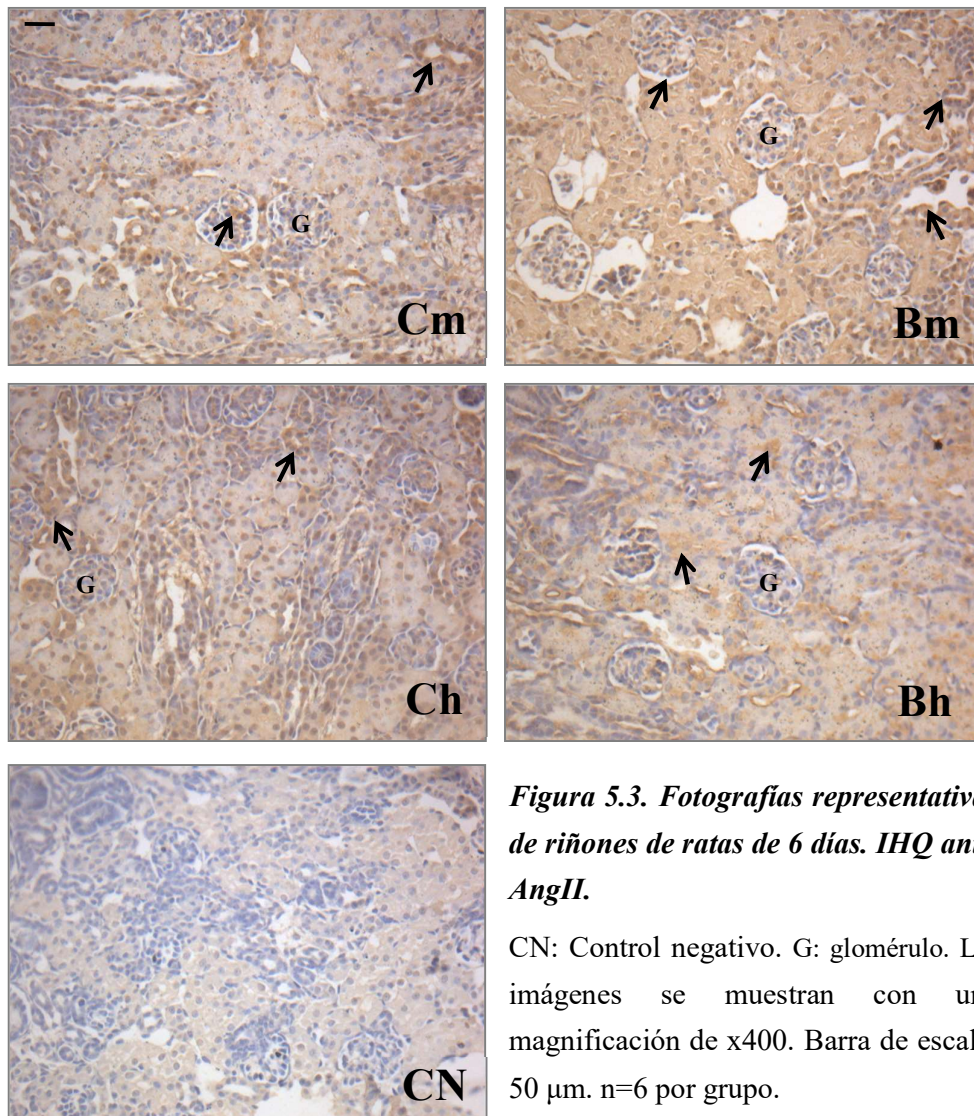


*Figura 5.2. Efecto de la restricción de zinc sobre el contenido de AngII (A) y de Ang-(1-7) (B), en tejido renal de crías de 6 días de vida. C. Relación entre el contenido*

**renal de AngII/Ang-(1-7)**. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM, n=8 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores. Interacción dieta x sexo: significativa ( $p < 0,01$ ). Los efectos simples fueron analizados mediante el test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples entre los subgrupos de interés: \* $p < 0,01$  vs Cm; <sup>o</sup> $p < 0,01$  vs Bm.

### **Inmunohistoquímica de AngII en tejido renal de ratas de 6 días de vida**

Para determinar la localización tisular de la AngII en la corteza renal fue utilizada la técnica IHQ. Los resultados obtenidos por el análisis de las imágenes obtenidas están en concordancia con los resultados obtenidos mediante la técnica de RIA (Cm:  $10,3 \pm 0,8$ ; Bm:  $17,2 \pm 1,1^*$ ; Ch:  $7,3 \pm 1,9$ ; Bh:  $12,1 \pm 2,3$ . % área teñida/ área total. \* $p < 0,01$  vs Cm). En la **figura 5.3**. se observa que los machos deficientes en zinc tuvieron mayor marcación que los controles, y no se observaron diferencias entre las hembras La AngII se encuentra localizada en los glomérulos y en los túbulos en formación.



**Figura 5.3. Fotografías representativas de riñones de ratas de 6 días. IHQ anti-AngII.**

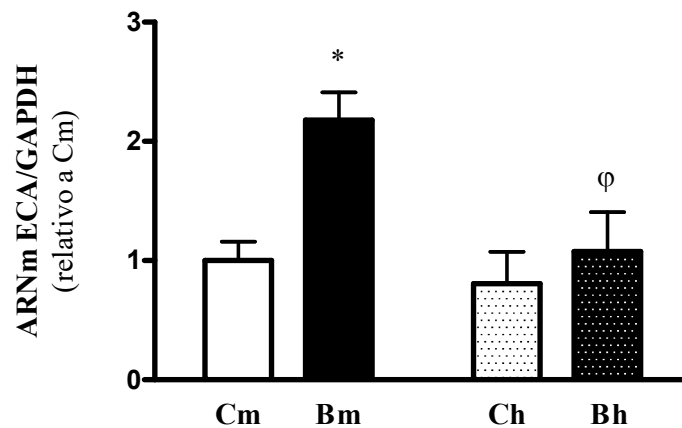
CN: Control negativo. G: glomérulo. Las imágenes se muestran con una magnificación de x400. Barra de escala: 50  $\mu$ m. n=6 por grupo.



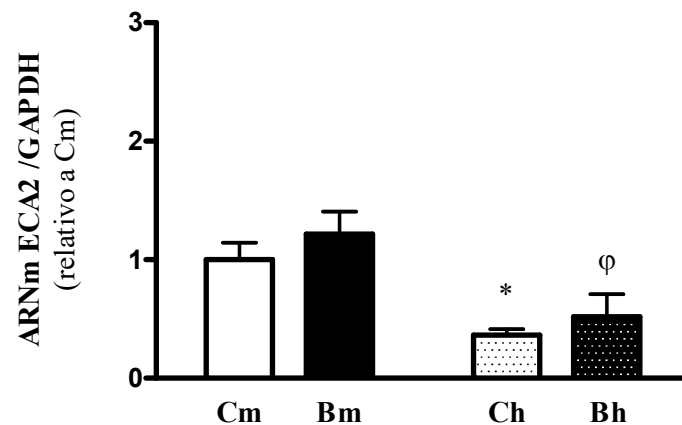
## Niveles de expresión del ARNm de las enzimas ECA y ECA2

Teniendo en cuenta los efectos de la deficiencia de zinc sobre los niveles renales de AngII y de Ang-(1-7), y considerando que ECA y ECA2 son las principales enzimas involucradas en la formación de dichos péptidos, se midieron los niveles de ARNm de dichas enzimas por RT-qPCR en riñón de ratas de 6 días de vida. Como se observa en la **figura 5.4.A**, los niveles de ARNm de ECA se encontraron aumentados en los machos bajos en zinc respecto de sus controles. Sin embargo, la restricción de zinc no indujo cambios en los niveles de ARNm de ECA en las hembras. En cuanto a ECA2, los machos presentaron mayores niveles de ARNm de esta enzima, sin observarse diferencias inducidas por la deficiencia de zinc (**figura 5.4.B**)

A.



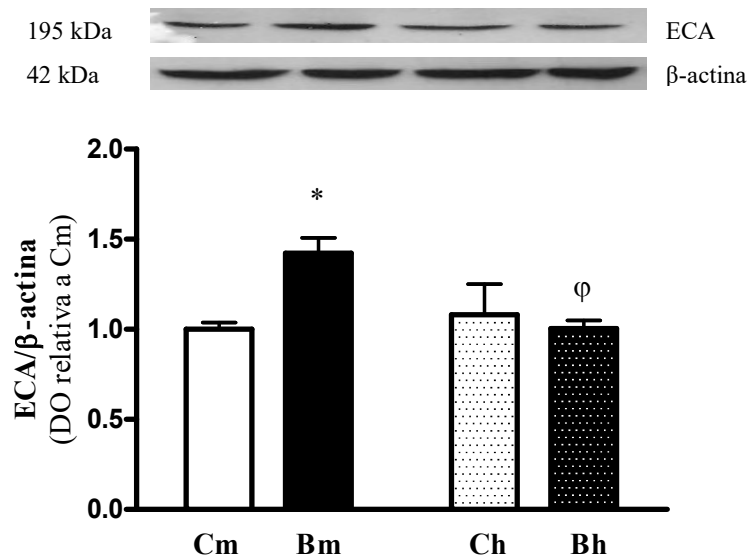
B.



**Figura 5.4. Efecto de la restricción de zinc sobre los niveles de ARNm de ECA (A) y ECA2 (B) en tejido renal de crías de 6 días de vida.** Los valores son expresados como la Media  $\pm$  EEM y fueron analizados con ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori Bonferroni; Interacción dieta por sexo significativa ( $p < 0,01$ ) en el caso de ARNm de ECA,  $n = 6$  por grupo. \* $p < 0,01$  vs Cm;  $\phi p < 0,01$  vs Bm.

### Niveles proteicos de la ECA

Dadas las diferencias observadas en la expresión del ARNm de ECA en las crías macho deficientes en zinc, se evaluaron los niveles proteicos de dicha enzima mediante la técnica de Western blot. En concordancia con los resultados obtenidos en la cuantificación del ARNm de la ECA, los machos deficientes presentaron mayores niveles proteicos de la enzima respecto a los controles. Además, la deficiencia de zinc no indujo cambios en los niveles proteicos de ECA entre las hembras (**figura 5.5**).



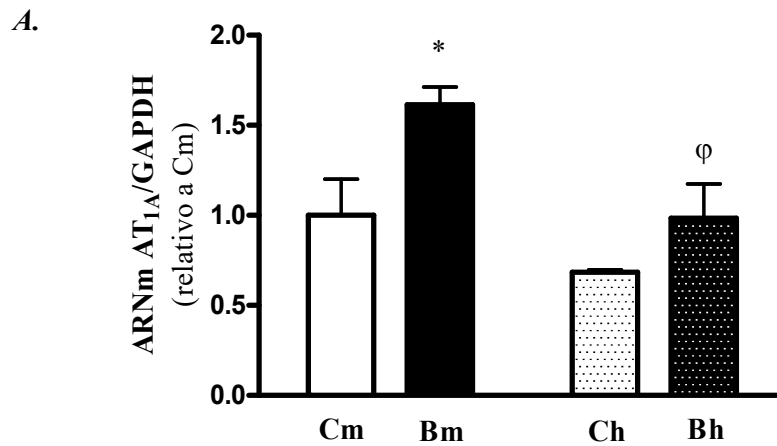
**Figura 5.5. Niveles proteicos de ECA en tejido renal de crías de 6 días de vida.**

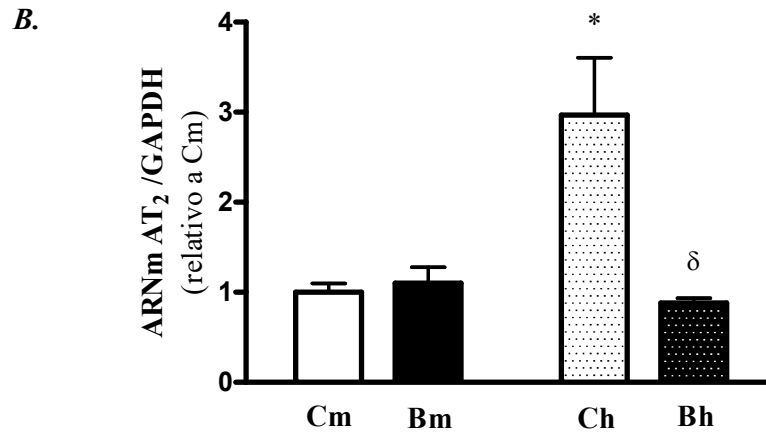
Se muestran bandas representativas correspondientes a ECA y a las  $\beta$ -actina, obtenidas por la técnica de Western Blot. DO: densidad óptica. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM,  $n = 6$  por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 vías. Interacción dieta x sexo: significativa ( $p < 0,05$ ). Los efectos simples fueron analizados mediante el test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples entre los subgrupos de interés: \* $p < 0,05$  vs Cm;  $\phi p < 0,05$  vs Bm.

## Expresión del ARNm de los receptores de AngII: AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub>

Teniendo en cuenta las alteraciones inducidas por la restricción dietaria de zinc durante etapas tempranas del crecimiento sobre los niveles de AngII, se evaluó la expresión del ARNm de los receptores AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub>.

Los machos deficientes en zinc tuvieron mayores niveles de ARNm del receptor AT<sub>1A</sub> que los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos de hembras (**figura 5.5.A**). En cuanto a los niveles del ARNm de AT<sub>2</sub> se encontraron diferencias entre ambos sexos. Como se observa en la **figura 5.5.B**, el grupo de las hembras controles presentó niveles elevados de ARNm de AT<sub>2</sub> con respecto al grupo de los machos controles, mientras que la deficiencia de zinc los redujo sólo entre las hembras.

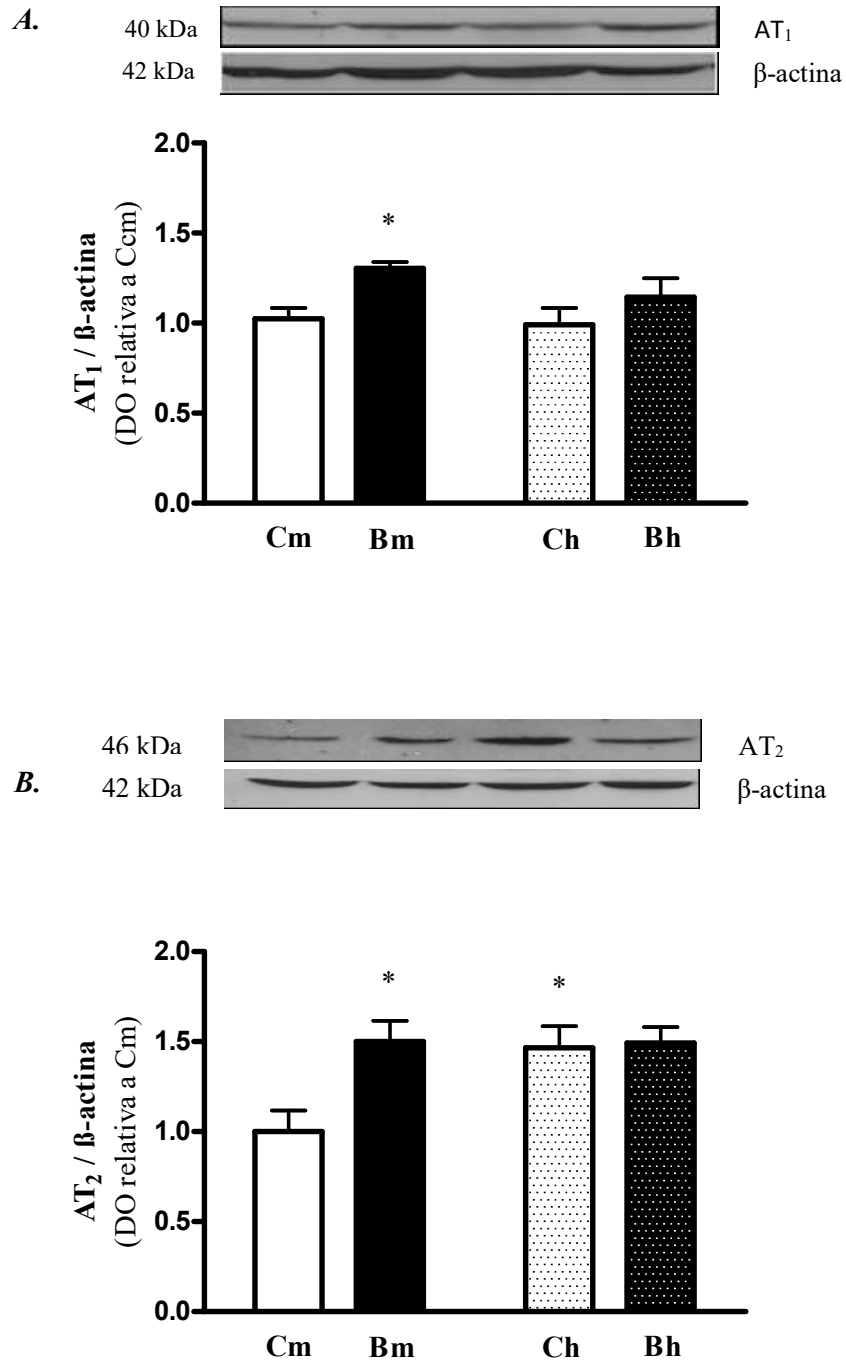




**Figura 5.5. Efecto de la restricción de zinc sobre los niveles de ARNm de AT<sub>1A</sub> (A) y AT<sub>2</sub> (B) en tejido renal de crías de 6 días de vida.** Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM y fueron analizados con ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori Bonferroni; Interacción dieta por sexo significativa ( $p < 0,01$ ) en el caso de ARNm de AT<sub>2</sub>,  $n=6$  por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Cm;  $^{\circ}p < 0,05$  vs Bm;  $^{\delta}p < 0,05$  vs Ch.

### Expresión proteica de los receptores de AngII: AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>

Dadas las diferencias encontradas de los niveles de ARNm para los receptores de AngII, se evaluó mediante la técnica de Western blot los niveles proteicos de dichos receptores en el tejido renal de ratas de 6 días. En la **figura 5.6.** se muestran los resultados obtenidos. En coincidencia con lo observado en los niveles de ARNm, los niveles del receptor AT<sub>1</sub> de los machos con restricción de zinc fueron mayores en comparación con los controles (**figura 5.6.A**). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de hembras. En cuanto al receptor AT<sub>2</sub>, los machos deficientes presentaron niveles proteicos aumentados respecto a los controles. A su vez, se observó que las hembras controles presentaron una mayor expresión proteica de AT<sub>2</sub> en relación a sus respectivos machos. La deficiencia de zinc no indujo cambios en los niveles proteicos de este receptor entre las ratas hembras (**figura 5.6.B**).

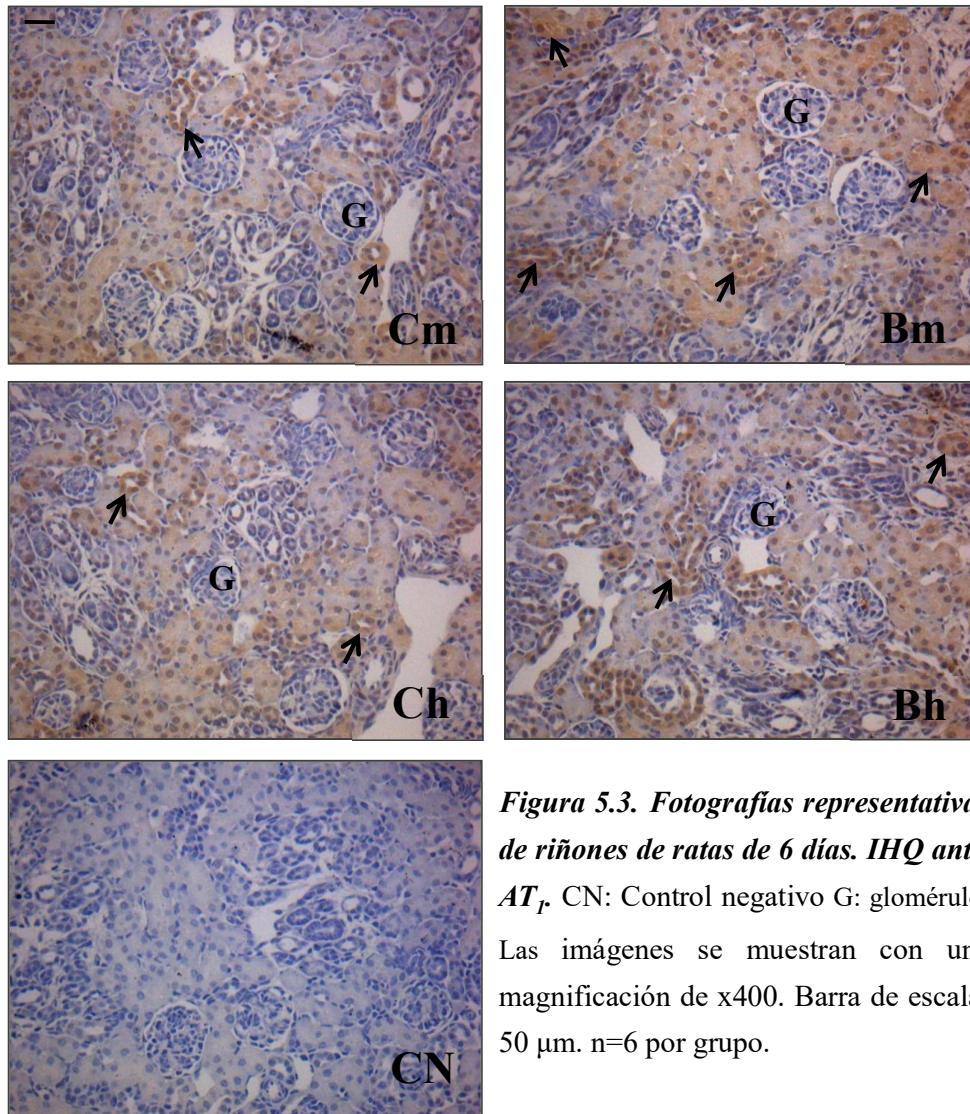


**Figura 5.6. Expresión proteica de receptores AT<sub>1</sub> (A) y AT<sub>2</sub> (B) en tejido renal de crías de 6 días de vida.** Se muestran bandas representativas correspondientes a AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y β-actina, obtenidas por la técnica de Western Blot. DO: densidad óptica. Los valores son expresados como la media ± EEM y fueron analizados con ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori

Bonferroni; Interacción dieta por sexo significativa ( $p < 0,05$ ) en el caso de AT2,  $n=6$  por grupo.  
\* $p < 0,05$  vs Cm

### **Inmunohistoquímica del receptor AT<sub>1</sub> en tejido renal de ratas de 6 días de vida**

En cortes histológicos de riñón se evaluó la marcación de los receptores AT<sub>1</sub> presente en la zona cortical mediante la técnica de IHQ. Se observó marcación inmunoreactiva en la zona de los túbulos proximales y distales en formación, principalmente (**figura 5.7**). En concordancia con los resultados obtenidos por WB, los machos deficientes en zinc tuvieron mayor marcación que los controles ( $6,1 \pm 0,5$ ; Bm:  $10,2 \pm 0,6^*$ ; Ch:  $4,5 \pm 0,8$ ; Bh:  $7,2 \pm 0,8$ . \* $p < 0,01$  vs Cm). En la **figura 5.7**. se observan fotografías representativas de cada grupo evaluado.



**Figura 5.3.** Fotografías representativas de riñones de ratas de 6 días. IHQ anti-AT<sub>1</sub>. CN: Control negativo G: glomérulo; Las imágenes se muestran con una magnificación de x400. Barra de escala: 50  $\mu$ m. n=6 por grupo.

### 5.1.5 Registro del peso corporal, la longitud de la tibia y la concentración sérica de zinc de las ratas a los 81 días de vida

A los 81 días de vida se determinó el peso corporal y el largo de la tibia como indicadores de crecimiento. Las crías sometidas a una deficiencia de zinc durante toda su vida, tuvieron un menor peso corporal y longitud de la tibia respecto de los controles (**tabla 5.5**). Esto también fue observado en los grupos Bcm y Bch, por lo cual la restitución del adecuado aporte de zinc luego del destete no fue suficiente para revertir los efectos sobre el crecimiento de la injuria nutricional sufrida en los periodos tempranos de la vida. Las hembras de todos los grupos experimentales presentaron menores pesos corporales y longitud de sus tibias en comparación con los machos.

En cuanto al consumo diario de alimento no se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados, por lo cual no fue necesario introducir un grupo de alimentación pareado en este trabajo (**tabla 5.5**).

Con el fin de evaluar el estado nutricional respecto del zinc, se determinó la concentración de este micronutriente en suero. A los 81 días de vida, las crías Bbm y Bbh presentaron menores concentraciones séricas de zinc que los respectivos controles. Los grupos a los cuales se les restituyeron el aporte de zinc en la dieta luego del destete (Bcm y Bch), tuvieron niveles de zinc sérico similares a sus respectivos controles (**tabla 5.5**).

	<b>Ccm</b>	<b>Bbm</b>	<b>Bcm</b>	<b>Cch</b>	<b>Bbh</b>	<b>Bch</b>
<b>PC (g)</b>	387 ± 5	315 ± 9*	348 ± 7* <sup>φ</sup>	253 ± 4*	216 ± 4 <sup>δφ</sup>	220 ± 5 <sup>δγ</sup>
<b>LT (cm)</b>	3,90±0,03	3,64±0,03*	3,72±0,03*	3,54±0,02*	3,39±0,02 <sup>δφ</sup>	3,37±0,02 <sup>δγ</sup>
<b>IDP (g/día)</b>	22,2 ± 0,9	22,9 ± 0,9	23,0 ± 0,9	22,5 ± 0,9	21,6 ± 1,1	22,5 ± 0,8
<b>CZ (µg/dl)</b>	160 ± 9	120 ± 5* <sup>γ</sup>	147 ± 10	158 ± 6	106 ± 7 <sup>δ</sup>	150 ± 6 <sup>β</sup>

**Tabla 5.5. Peso corporal, longitud de la tibia, consumo de alimento y concentración sérica de zinc en ratas de 81 días.** PC: peso corporal; LT: longitud de tibia; IDP: ingesta diaria promedio; CZ: concentración de zinc sérica. Los valores se expresan como la media ± EEM, n=12 por grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA de 2 factores. Interacción dieta x sexo: significativo (p<0.001). Los efectos simples fueron analizados mediante el test a posteriori de



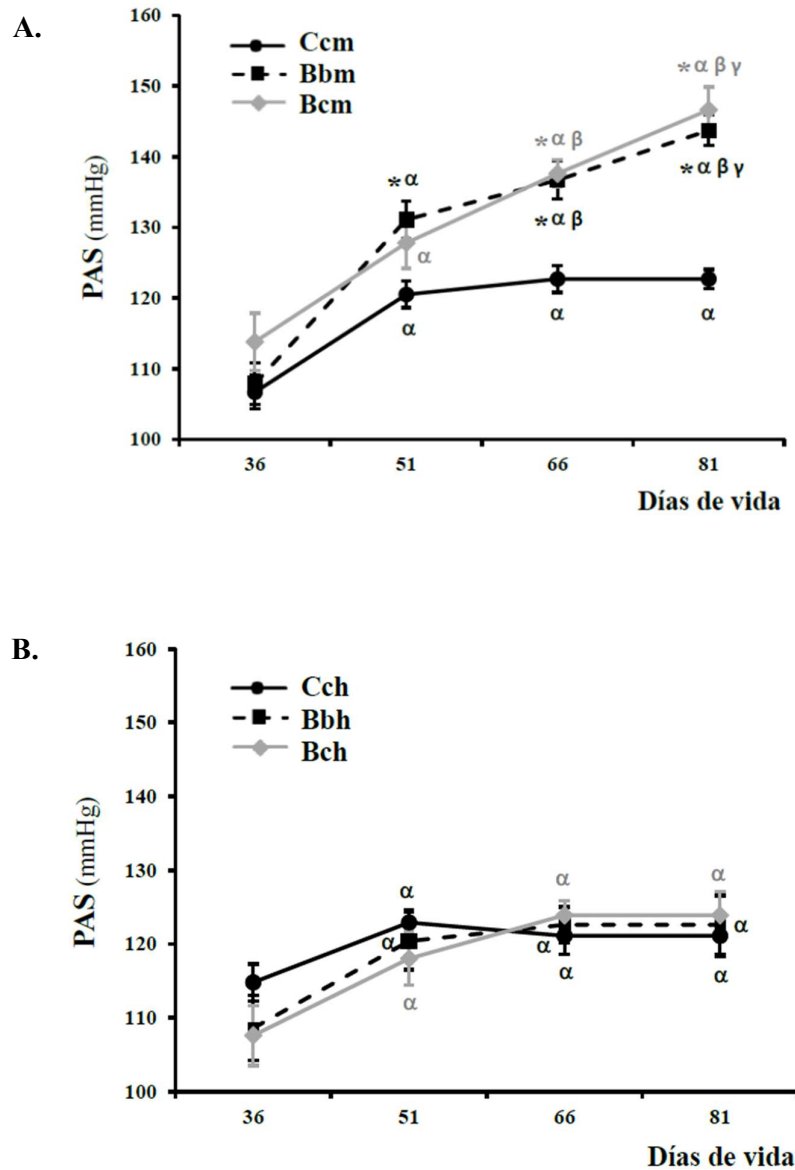
Bonferroni para comparaciones múltiples entre los subgrupos de interés: <sup>\*</sup>p<0,01 vs Ccm; <sup>°</sup>p<0,01 vs Bbm; <sup>γ</sup>p<0,01 vs Bcm; <sup>δ</sup>p<0,01 vs Cch; <sup>β</sup>p<0,01 vs Bbh.

### 5.1.6 Registro de la presión arterial sistólica a los 36, 51, 66 y 81 días de vida

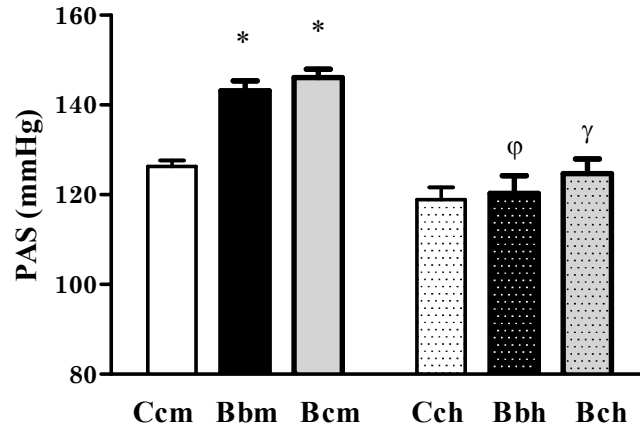
Se registró la PAS cada 15 días luego del destete de las crías machos y hembras. La presión arterial aumentó gradualmente en los 6 grupos experimentales hasta los 51 días de vida (**figura 5.8**). Los valores de PAS continuaron incrementándose hasta los 81 días en las crías Bbm y Bcm. Por otro lado, los animales Ccm y Cch y los grupos de hembras deficientes (Bbh y Bch) no presentaron cambios significativos de la PAS luego de los 51 días de vida.

Los animales Bbm presentaron valores de PAS mayores a los del grupo Ccm a los 51, 66 y 81 días de vida, mientras que en el grupo Bcm se evidenciaron mayores valores de PAS que el grupo Ccm a los 66 y 81 días de vida (**figura 5.8**). El incremento de la PAS fue similar en Bbm y Bcm, y ambos grupos alcanzaron valores superiores a 140 mmHg a los 81 días. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los valores de PAS entre los grupos de hembras en ninguno de los tiempos experimentales evaluados.

Al día 81 ambos grupos de ratas machos que tuvieron restricción de zinc en algún período del crecimiento mostraron valores de PAS compatibles con hipertensión arterial, esto no fue observado en las ratas hembras. Estos resultados fueron coincidentes con lo observado en estudios anteriores de nuestro laboratorio (*Tomat AL y col., 2013b*). Los animales Ccm y Cch presentaron valores de PAS similares (**figura 5.9**). Sin embargo, las ratas Bbm y Bcm mostraron mayores niveles de PAS que las respectivas hembras Bbh y Bch, respectivamente.



**Figura 5.8. Presión arterial sistólica durante el crecimiento post-destete.** PAS: presión arterial sistólica; en ratas macho (A) y hembras (B). Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM y fueron analizados con ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori Bonferroni;  $n=10$  por grupo. \* $p<0,05$  vs Ccm;  $^{\alpha}p<0,01$  vs 36 días de vida;  $^{\beta}p<0,05$  vs 51 días;  $^{\gamma}p<0,05$  vs 66 días.



**Figura 5.9. Presión arterial sistólica en ratas de 81 días de vida.** PAS: presión arterial sistólica. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM y fueron analizados con ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori Bonferroni;  $n=10$  por grupo. Interacción dieta por sexo significativa ( $p<0,01$ ). \* $p<0,05$  vs Ccm;  $^{\dagger}p<0,05$  vs Bbm;  $^{\S}p<0,05$  vs Bcm.

### 5.1.7 Estudio de la participación del SRA renal en las ratas machos y hembras expuestas a una deficiencia moderada de zinc a los 81 días de vida

Como se ha mostrado en las ratas de 6 días de vida en el presente trabajo, la deficiencia de zinc durante el desarrollo fetal y postnatal temprano indujo alteraciones en la morfología renal y en el SRA, principalmente en las crías machos. Teniendo en cuenta estos resultados, y considerando que en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación demostramos que en ratas machos adultas con restricción de zinc también se observaban alteraciones morfológicas y funcionales renales, el objetivo fue evaluar en ratas adultas con deficiencia de zinc como se encuentra el SRA de la corteza renal.

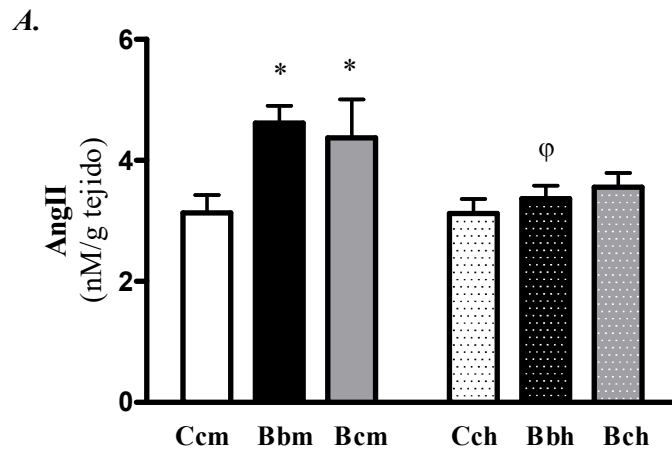
#### Registro del peso renal

Al final del periodo experimental se determinó el peso de los riñones y se expresaron en relación a la longitud de la tibia. Todos los grupos de ratas que tuvieron restricción de zinc en algún periodo del crecimiento mostraron menores pesos renales que sus controles (PR/LT (g/cm)). Ccm:  $0,34\pm 0,01$ ; Bbm:  $0,27\pm 0,01^*$ ; Bcm:  $0,30\pm 0,01^*$ ;

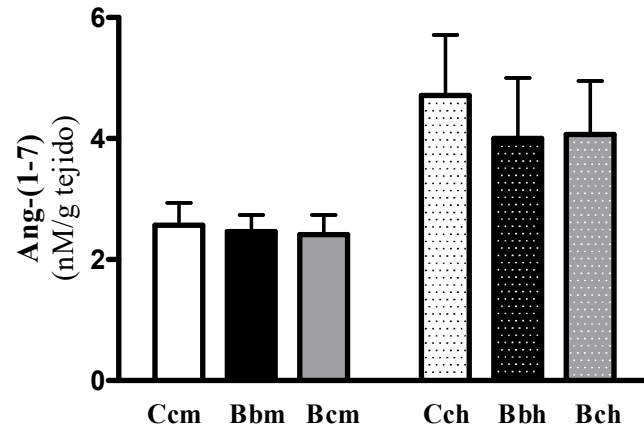
Cch:  $0,27 \pm 0,01^*$ ; Bbh:  $0,21 \pm 0,01^{\delta\phi}$ ; Bch  $0,21 \pm 0,01^{\delta\gamma}$ .  $^*p < 0,05$  vs Ccm;  $^{\phi}p < 0,05$  vs Bbm;  $^{\gamma}p < 0,05$  vs Bcm;  $^{\delta}p < 0,05$  vs Cch). A su vez, los tres grupos de ratas hembras mostraron menores pesos que los machos.

### Contenido de AngII y Ang-(1-7) en la corteza renal

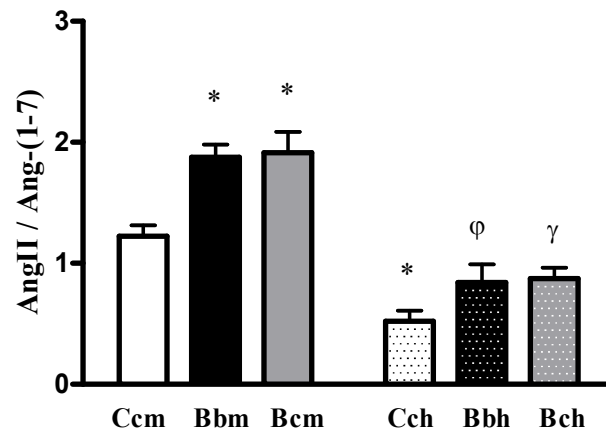
La **figura 5.9.A** muestra los niveles de AngII obtenidos mediante la técnica de RIA en corteza renal de las crías a los 81 días de vida. Las crías macho que tuvieron restricción de zinc en algún momento de su vida (Bbm y Bcm) presentaron mayores niveles de AngII en corteza renal respecto de los controles. En cuanto a las crías hembras, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. En la **figura 5.9.B** se muestra el contenido de Ang-(1-7) en la corteza renal, y no se hallaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Al evaluar las relaciones entre ambos péptidos (AngII / Ang-(1-7)) se observó que fue mayor en los grupos Bbm y Bcm respecto a su control, mientras que entre los grupos de hembras no se vieron diferencias significativas. Por otro lado, los tres grupos de hembras presentaron menor relación AngII / Ang-(1-7) respecto a los respectivos machos (**figura 5.9.C**).



B.



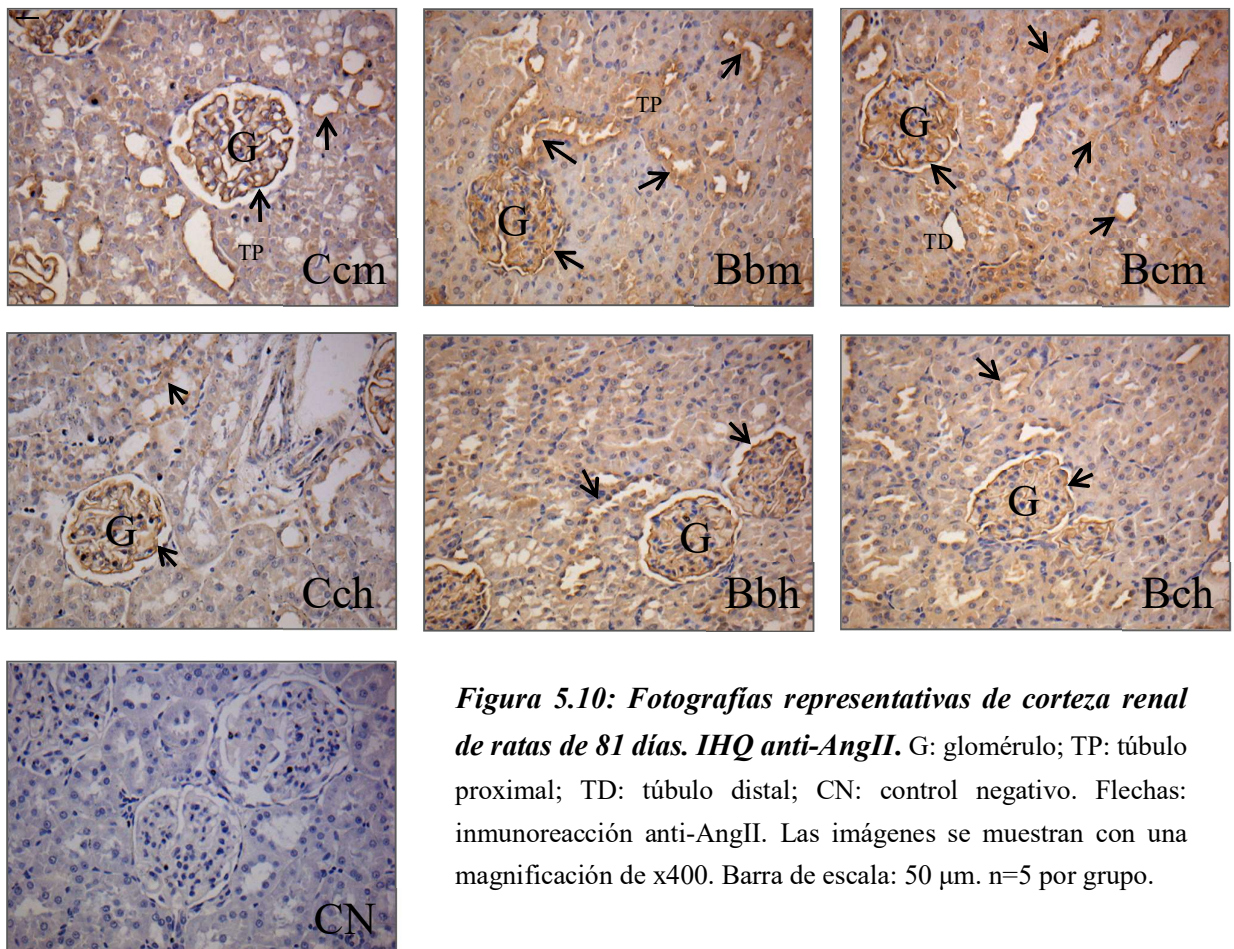
C.



**Figura 5.9. Efecto de la restricción de zinc sobre el contenido de AngII y Ang-(1-7) en corteza renal de ratas de 81 días de vida. Niveles de AngII (A) y de Ang-(1-7) (B), y relación AngII / Ang-(1-7) (C).** Los valores se expresan como la media EEM, n=7 por grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA de 2 factores. Interacción dieta x sexo: significativo ( $p < 0,001$ ). Los efectos simples fueron analizados mediante el test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples entre los subgrupos de interés: \* $p < 0,01$  vs Ccm; <sup>φ</sup> $p < 0,01$  vs Bbm; <sup>γ</sup> $p < 0,01$  vs Bcm.

### Inmunohistoquímica de AngII en la corteza renal

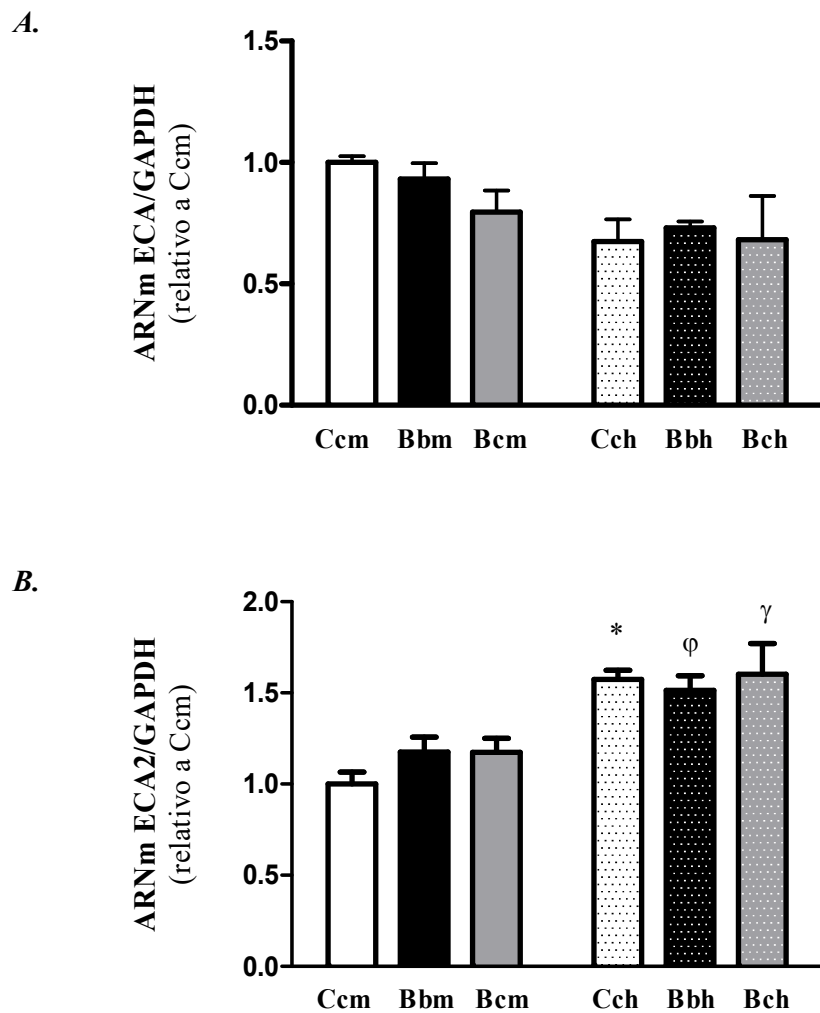
La técnica IHQ fue utilizada para determinar la localización tisular de la AngII y realizar un análisis semicuantitativo del contenido de este péptido en la corteza renal. Al analizar las imágenes obtenidas, en color marrón se observó una reacción positiva de AngII en los glomérulos y túbulos. A su vez, las ratas Bbm y Bcm presentaron una mayor tinción que los machos controles, en concordancia con los resultados obtenidos con la técnica de RIA (Ccm:  $9,1 \pm 0,6$ ; Bbm:  $14,3 \pm 0,7^*$ ; Bcm:  $12,6 \pm 0,8^*$ ; Cch:  $8,2 \pm 0,8$ ; Bbh:  $9,9 \pm 1,1$ ; Bch:  $8,5 \pm 0,8$ . % área teñida/ área total. \* $p < 0,05$  vs Ccm) (**Figura 5.10**).



**Figura 5.10:** Fotografías representativas de corteza renal de ratas de 81 días. IHQ anti-AngII. G: glomérulo; TP: túbulo proximal; TD: túbulo distal; CN: control negativo. Flechas: inmunoreacción anti-AngII. Las imágenes se muestran con una magnificación de x400. Barra de escala: 50 µm. n=5 por grupo.

### Expresión del ARNm de las enzimas ECA y ECA2 en la corteza renal

En la **figura 5.11.A** se muestran los resultados obtenidos del ARNm de ECA. La deficiencia de zinc durante la vida prenatal, la lactancia y/o el crecimiento post-destete no indujo cambios significativos en los niveles de ARNm de ECA ni de ECA2 en ratas de ambos sexos. Sin embargo, las hembras presentaron mayores niveles de ARNm de ECA2 que los machos (**figura 5.11.B**).



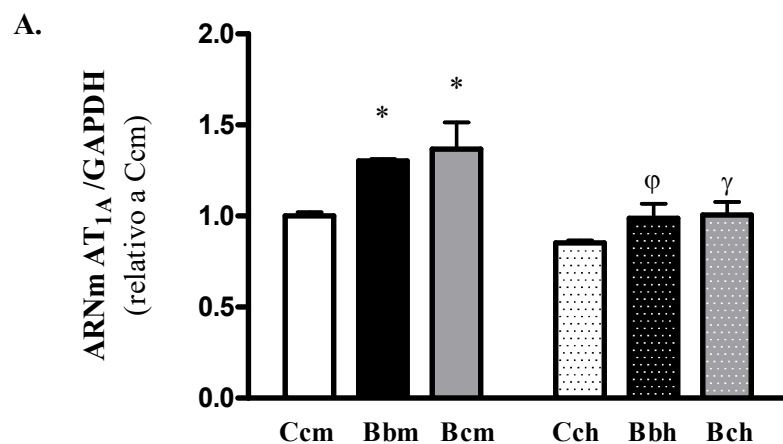
**Figura 5.11.** Efecto de la deficiencia de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre la expresión del ARNm de la ECA (A) y ECA2 (B) en tejido renal de crías de 81 días de vida de ambos sexos. ECA: enzima convertidora de Angiotensina, ECA2: enzima convertidora de Angiotensina tipo 2, GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando

ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples.  
 \* $p < 0,01$  vs. Ccm;  $\phi p < 0,05$  vs Bbm;  $\gamma p < 0,05$  vs Bcm

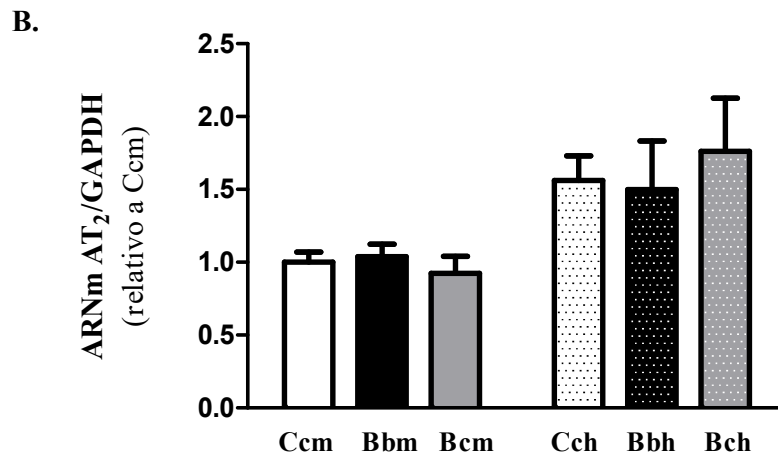
### Expresión del ARNm de los receptores de AngII: AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub> en la corteza renal

Dado que esta deficiencia de zinc indujo en ratas macho un aumento en los niveles de AngII en corteza renal, se procedió a evaluar los niveles de expresión génica de sus receptores (AT<sub>1A</sub> y AT<sub>2</sub>) mediante la técnica de RT-qPCR en corteza renal de ratas de 81 días de vida.

En la **figura 5.12.A** se observa que los machos con restricción de zinc durante toda su vida (Bbm) así como también aquellos que tuvieron la deficiencia sólo en el periodo de gestación y lactancia (Bcm) presentaron niveles superiores de ARNm de AT<sub>1</sub> en comparación con los controles Ccm. Al igual de lo observado en el contenido de AngII en las ratas hembras la restricción no indujo alteraciones en los receptores. En la **figura 5.12.B** se muestran los niveles de ARNm de AT<sub>2</sub>, y no se observaron cambios ni en machos ni en hembras.







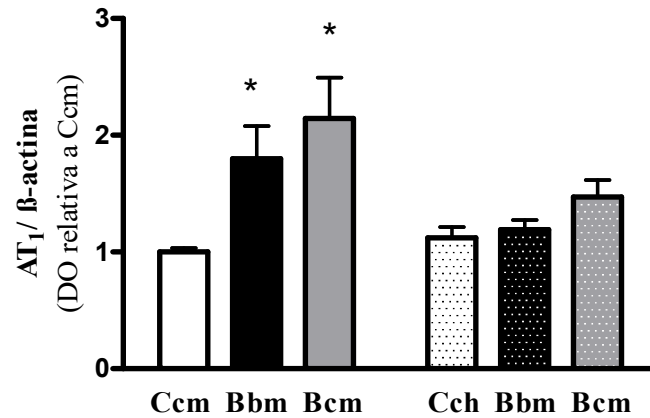
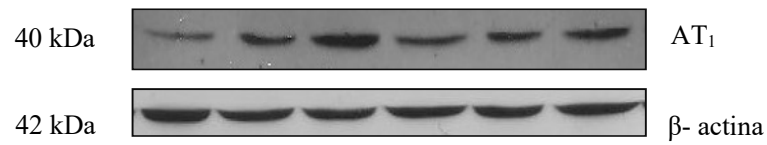
**Figura 5.12.** Efecto de la deficiencia de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre los niveles de ARNm de AT<sub>1A</sub> (A) y AT<sub>2</sub> (B) en tejido renal de crías de 81 días de vida de ambos sexos. GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,01 vs. Ccm; <sup>o</sup>p<0,05 vs Bbm; <sup>y</sup>p<0,05 vs Bcm.

### Expresión proteica de los receptores de AngII: AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en la corteza renal

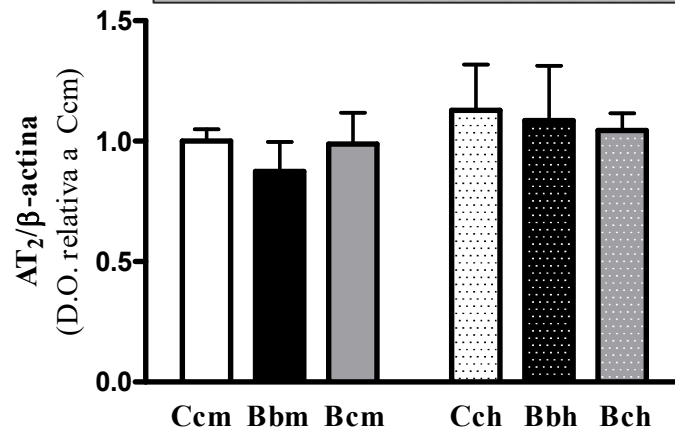
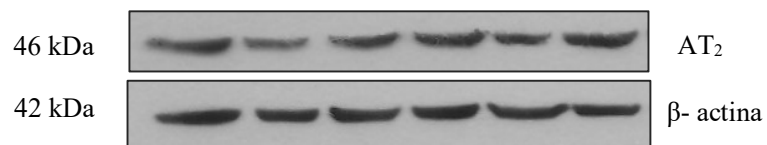
Dadas las diferencias descriptas anteriormente en los niveles de ARNm de los receptores de AngII, se evaluó la expresión proteica de los mismos en la corteza renal de ratas de 81 días mediante la técnica de Western blot.

Los machos que recibieron una dieta baja en zinc durante toda su vida, así como también los que sólo fueron sometidos a la deficiencia durante la vida fetal hasta la lactancia, presentaron una mayor expresión proteica del receptor AT<sub>1</sub> a nivel en la corteza renal respecto a los controles. En concordancia con los resultados obtenidos para los niveles de ARNm, no se observaron diferencias en el contenido proteico de AT<sub>1</sub> entre los grupos experimentales de ratas hembras (**figura 5.13.A**). La **figura 5.13.B** muestra que la restricción dietaria de zinc durante las diferentes etapas de la vida no indujo cambios en los niveles proteicos del receptor AT<sub>2</sub> en las crías hembras y machos adultos jóvenes.

A.



B.



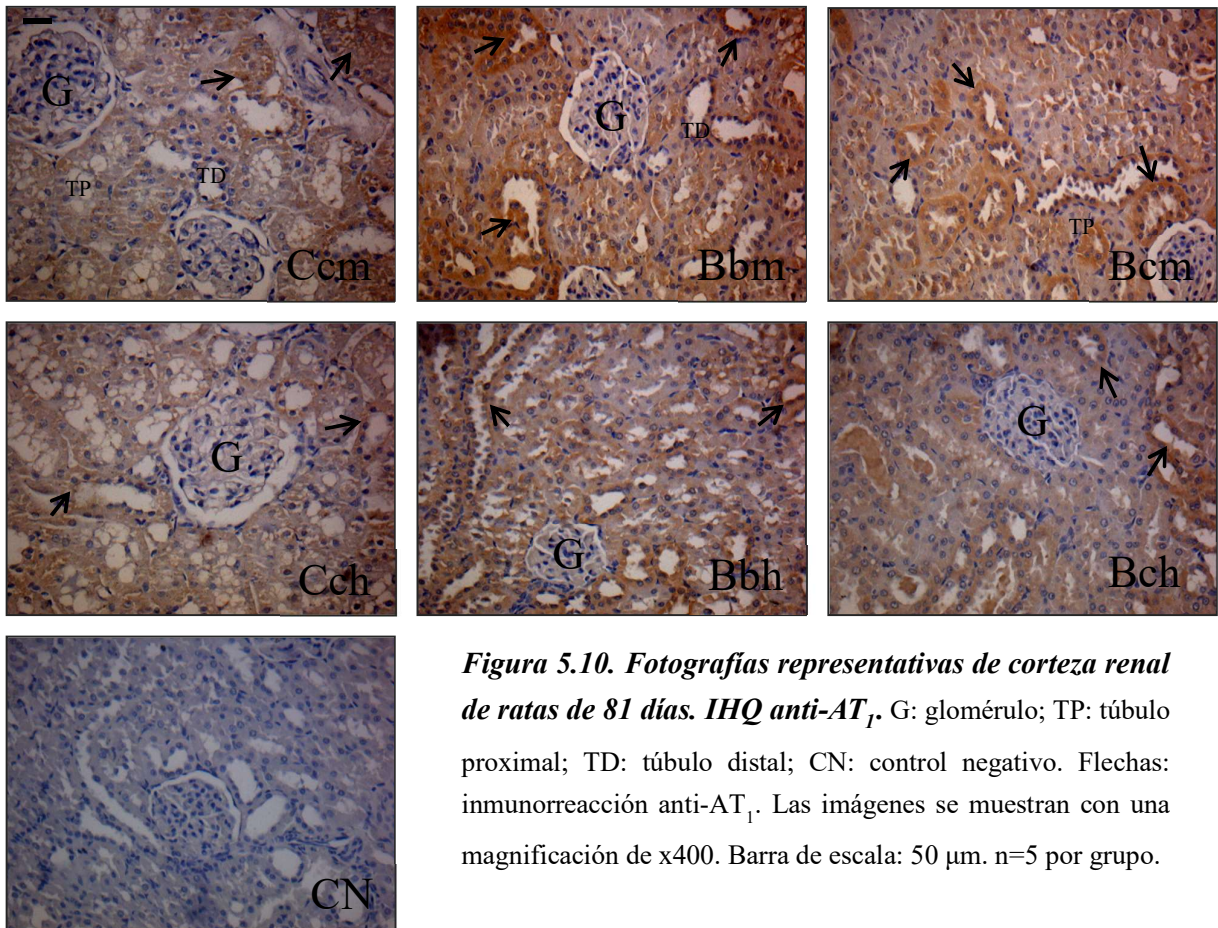
**Figura 5.13.** Niveles de expresión proteica del receptor  $AT_1$  (A) y del receptor  $AT_2$  (B), en corteza renal de crías de 81 días de ambos sexos. Se muestran bandas representativas correspondientes a  $AT_1$ ,  $AT_2$  y  $\beta$ -actina obtenidas por la técnica de Western Blot. DO: densidad óptica. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM,  $n=6$  por grupo. Los datos

fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p < 0,05$  vs Ccm.

### **Inmunohistoquímica del receptor AT<sub>1</sub> en la corteza renal**

En línea con estos resultados, el análisis de las imágenes microscópicas obtenidas con la técnica IHQ reveló un incremento en el área inmunoreactiva de AT<sub>1</sub> en relación al área de tejido total en las ratas Bbm y Bcm en comparación con Ccm (Ccm:  $7,9 \pm 0,8$ ; Bbm:  $14,4 \pm 1,4^*$ ; Bcm:  $13,3 \pm 1,4^*$ ; % área teñida/área total, \* $p < 0,05$  vs Ccm). Entre los grupos de hembras no se observaron diferencias en este parámetro (Cch:  $4,9 \pm 0,9$ ; Bbh:  $9,6 \pm 1,2$ ; Bch:  $8,4 \pm 0,8$ ).

En la **figura 5.14** se muestran fotografías representativas de la corteza renal, correspondientes a la inmunomarcación para el receptor AT<sub>1</sub>. Se observa marcación positiva en color marrón en los túbulos distales y túbulos proximales, mayoritariamente en este último.



**Figura 5.10. Fotografías representativas de corteza renal de ratas de 81 días. IHQ anti-AT<sub>1</sub>.** G: glomérulo; TP: túbulo proximal; TD: túbulo distal; CN: control negativo. Flechas: inmunorreacción anti-AT<sub>1</sub>. Las imágenes se muestran con una magnificación de x400. Barra de escala: 50  $\mu$ m. n=5 por grupo.

### 5.1.8 Estudio del SRA cardíaco en las ratas machos y hembras expuestas a una deficiencia moderada de zinc a los 81 días de vida

En estudios previos, hemos demostrado que la deficiencia de zinc indujo alteraciones morfológicas y funcionales a nivel cardíaco en ratas adultas. Los cambios fueron más evidentes en las ratas machos en comparación con las hembras ya que éstas no presentaron alteraciones cardíacas estructurales o funcionales significativas ni aumento de la PA (Tomat A, et al. 2013b; Juriol L, et al. 2016). Teniendo en cuenta estos antecedentes se evaluó el estado del SRA cardíaco en ratas machos y hembras que fueron expuestas a esta deficiencia de zinc durante el desarrollo fetal, la lactancia y/o el crecimiento post-destete.

#### Registro del peso cardíaco

En las ratas de 81 días se determinó el peso cardíaco, del ventrículo izquierdo, del ventrículo derecho y de las aurículas, los cuales se expresaron respecto a la longitud de la tibia. Como se muestra en la **tabla 5.6**, los animales machos y hembras que recibieron dieta baja en zinc durante algún período de su crecimiento presentaron menores pesos del corazón y del ventrículo izquierdo. En las crías Bbm y Bcm se observó, a su vez, una disminución del peso de ventrículo derecho en comparación con Ccm. Por otro lado, las hembras presentaron menores pesos cardíacos, del ventrículo izquierdo y del ventrículo derecho en relación a los machos. No se observaron diferencias significativas en el peso de las aurículas entre los grupos experimentales evaluados.

	<b>Ccm</b>	<b>Bbm</b>	<b>Bcm</b>	<b>Cch</b>	<b>Bbh</b>	<b>Bch</b>
<b>PCor/LT (mg/cm)</b>	30±1	26±1*	26±2*	24±1*	20±2 <sup>δφ</sup>	22±2 <sup>δγ</sup>
<b>PVI/LT (mg/cm)</b>	21±1	18±1*	19±1*	17±1*	14±1 <sup>δφ</sup>	15±1 <sup>δγ</sup>
<b>PVD/LT (mg/cm)</b>	5,4±0,1	4,7±0,1*	4,5±0,2*	3,8±0,1*	3,4±0,1 <sup>φ</sup>	3,4±0,1 <sup>γ</sup>
<b>PAU/LT (mg/cm)</b>	1,9±0,2	1,8±0,2	1,7±0,1	1,5±0,1	1,3±0,1	1,7±0,1

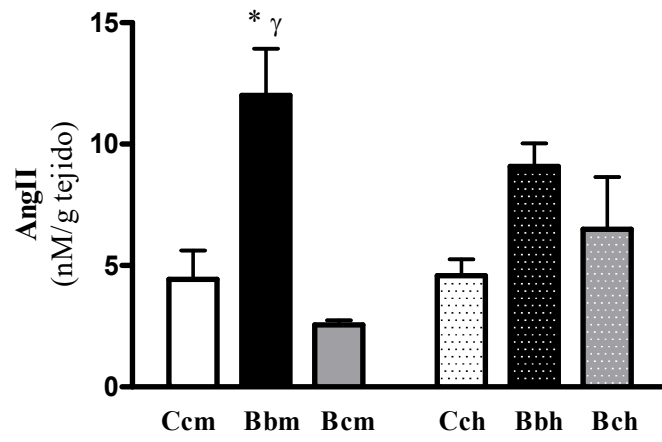
**Tabla 5.6. Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre el peso cardíaco, del ventrículo izquierdo, del ventrículo derecho y de las aurículas de ratas de 81 días de vida.** LT: largo de tibia, PCor: peso cardíaco, PVI: peso de ventrículo izquierdo, PVD: peso de ventrículo derecho, PAU: peso de aurículas. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  EEM, n=12 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm;  $\delta$ p<0,05 vs Cch;  $\phi$ p<0,05 vs Bbm;  $\gamma$ p<0,05 vs Bcm.

### Contenido de AngII y Ang-(1-7) del ventrículo izquierdo

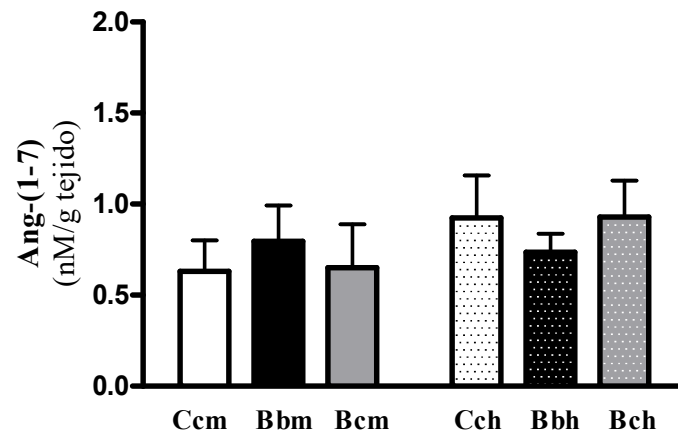
La **figura 5.15** muestra los niveles de AngII y de Ang-(1-7) medidos en ventrículo izquierdo de las crías a los 81 días de vida. Las crías macho que tuvieron deficiencia de zinc desde la vida prenatal hasta la adultez presentaron mayores niveles de AngII respecto a las controles. La administración de una dieta con contenido adecuado de zinc durante el crecimiento post-destete revirtió esta alteración. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el contenido ventricular de AngII entre los grupos de hembras (**figura 5.15.A**).

En cuanto a los niveles de Ang-(1-7), no se encontraron diferencias entre los grupos evaluados (**figura 5.15.B**). Sin embargo, al calcular la relación entre los niveles de AngII y Ang-(1-7), se observó que esta fue mayor tanto en los machos como en las hembras sometidas a la restricción de zinc durante toda su vida (**figura 5.15.C**).

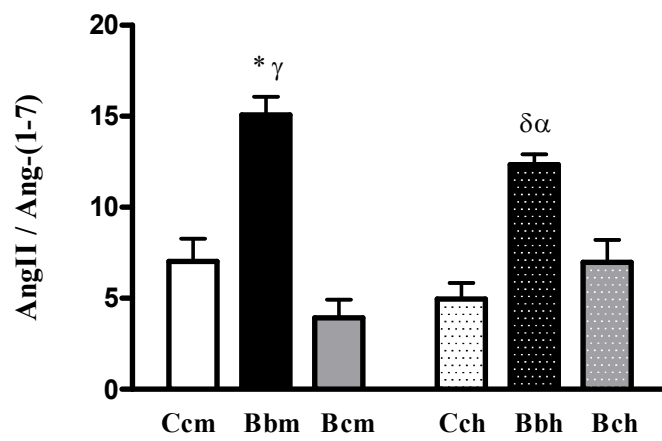
A.



B.



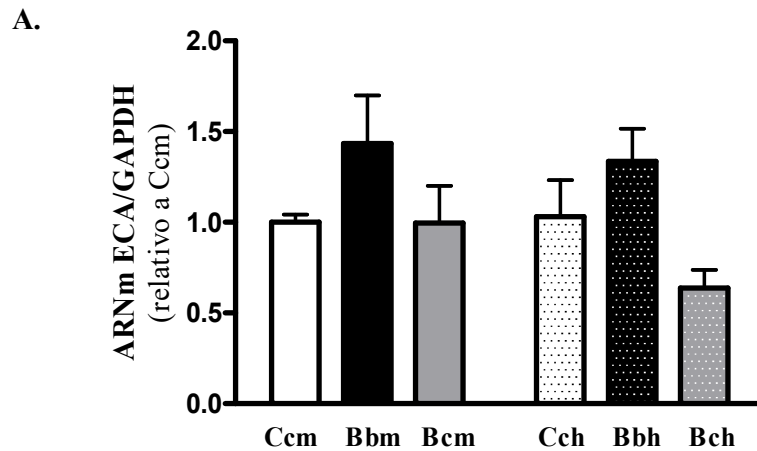
C.



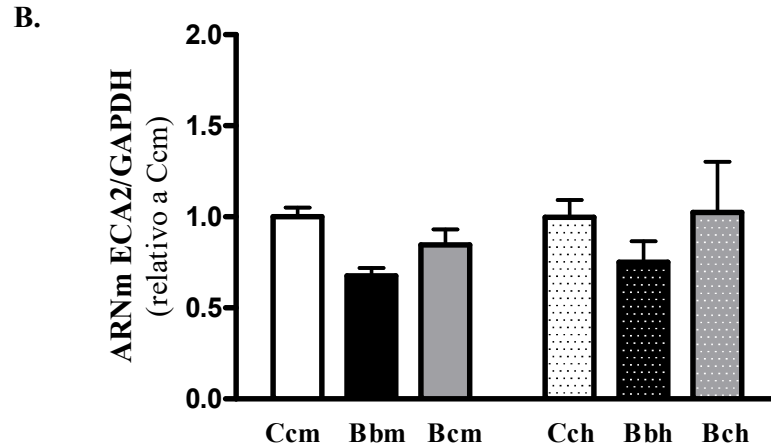
**Figura 5.15. Efecto de la restricción de zinc sobre el contenido de AngII y Ang-(1-7) en ventrículo izquierdo de ratas de 81 días de vida. Niveles de AngII (A) y de Ang-(1-7) (B) y la relación entre AngII / Ang-(1-7) (C).** Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM, n=7 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test post hoc Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm; <sup>γ</sup>p<0,05 vs Bcm; <sup>δ</sup>p<0,05 vs Cch; <sup>α</sup>p<0,05 vs Bch.

### Expresión del ARNm de las enzimas ECA y ECA2 en el ventrículo izquierdo

En la **figura 5.16.A y B**, observamos los niveles del ARNm de la ECA y de ECA2, respectivamente, en el ventrículo izquierdo de las ratas machos y hembras adultas. La deficiencia de zinc durante la vida prenatal, la lactancia y/o luego del destete no indujo cambios en los niveles de ARNm de dichas enzimas.





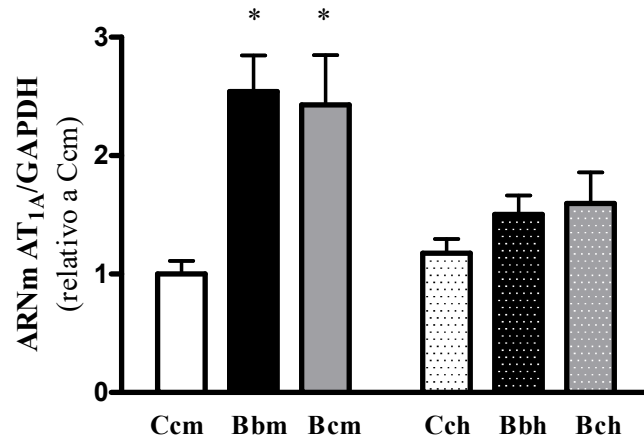


**Figura 5.16.** Efecto de la deficiencia de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre los niveles del ARNm de ECA (A) y de ECA2 (B) en el ventrículo izquierdo de ratas de 81 días de vida. ECA y ECA2: enzima convertidora de angiotensina tipo 1 y tipo 2, respectivamente. GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM,  $n=6$  por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p<0,05$  vs Ccm;  $^{\#}p<0,05$  vs Bch.

### Expresión del ARNm de los receptores de AngII: AT<sub>1A</sub> en el ventrículo izquierdo

Teniendo en cuenta los cambios observados en los niveles de AngII en el ventrículo de las ratas Bbm, evaluamos los niveles de ARNm del receptor AT<sub>1A</sub> por la técnica de RT-qPCR. Los animales Bbm y Bcm presentaron un incremento en la expresión del ARNm del receptor AT<sub>1A</sub> en comparación con los controles. Sin embargo, la deficiencia de zinc no generó cambios entre las hembras (**Figura 5.17**).

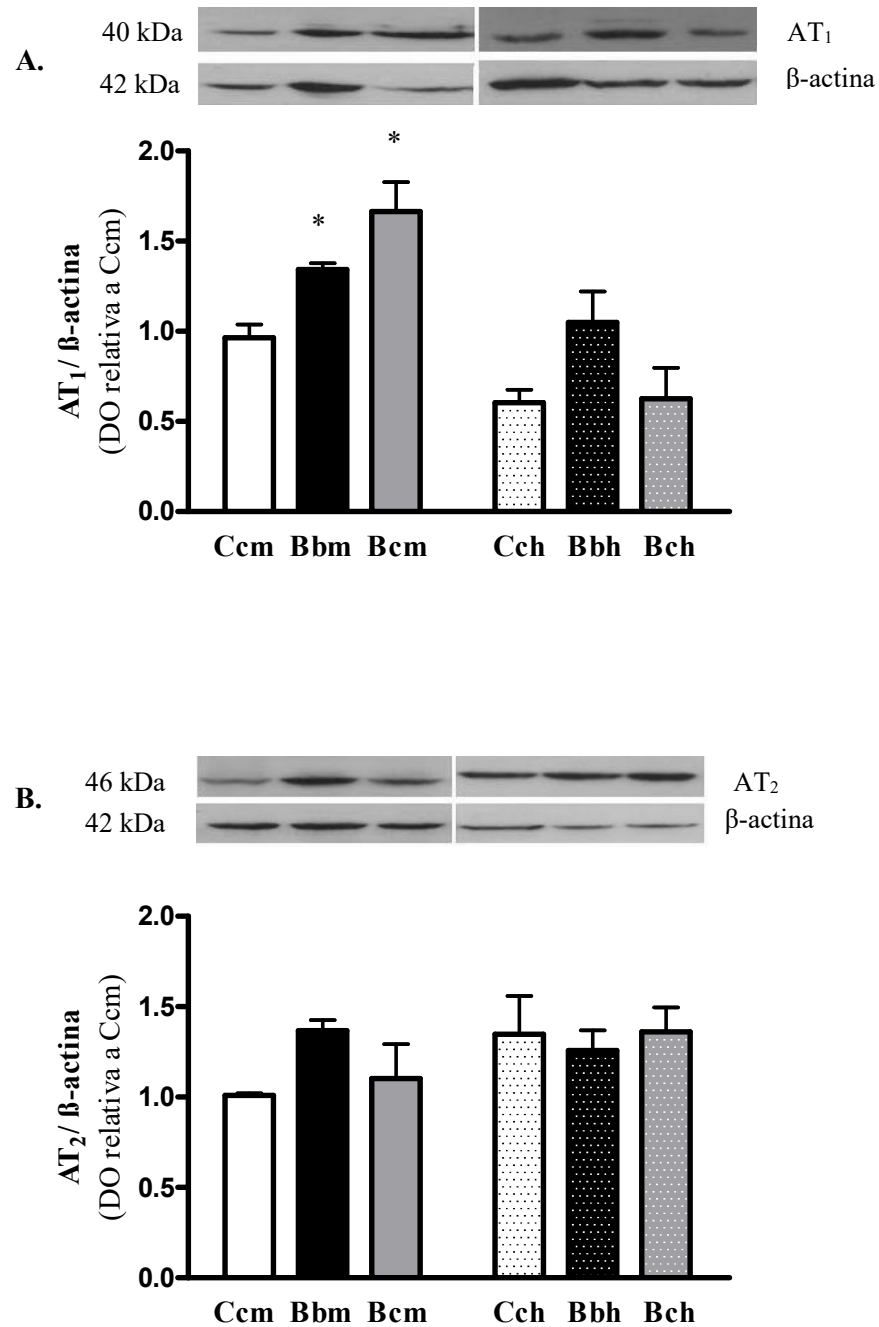
Por otro lado, los niveles de ARNm del receptor AT<sub>2</sub> a nivel cardíaco fueron muy bajos, por lo que la técnica utilizada no fue lo suficientemente sensible para realizar un adecuado análisis de los mismos.



**Figura 5.17.** Efecto de la deficiencia de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre los niveles del ARNm del receptor AT<sub>1A</sub> en el ventrículo izquierdo de ratas de 81 días de vida. GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Los valores son expresados como la media ± EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm.

### Expresión proteica de los receptores de AngII: AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en el ventrículo izquierdo

Se valuó si la deficiencia de zinc durante diferentes etapas del crecimiento induce cambios en la expresión proteica de los receptores de AngII (AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>) en el ventrículo izquierdo de ratas machos y hembras adultas. Como se muestra en la **figura 5.18.A**, los animales Bbm y Bcm presentaron un incremento en la expresión proteica de los receptores AT<sub>1</sub>, sin observarse diferencias entre las hembras. Este resultado está en concordancia con lo descrito anteriormente para los niveles de ARNm de dicho receptor. Respecto a la expresión proteica de AT<sub>2</sub>, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados (**figura 5.18.B**).

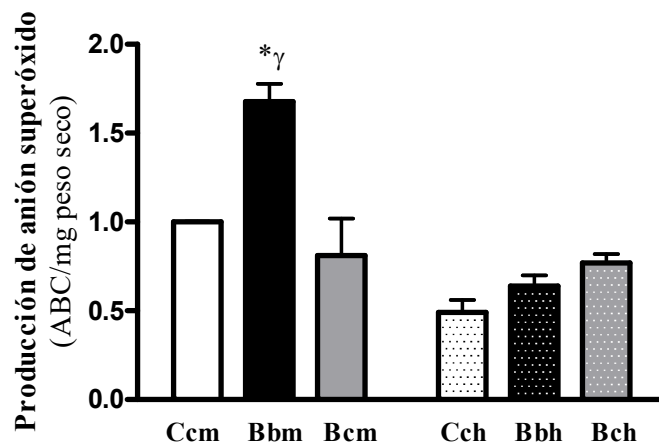


**Figura 5.18.** Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre la expresión proteica de AT<sub>1</sub> (A) y AT<sub>2</sub> (B) en el ventrículo izquierdo de las ratas de 81 días de vida. Se muestran bandas representativas correspondientes a AT<sub>1</sub> o AT<sub>2</sub> y a las β-actina, obtenidas por la técnica de Western Blot. DO: densidad óptica. Los valores son expresados como la media ± EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm.

### Producción de anión superóxido inducido por NADPH oxidasa

Es conocido el papel que cumple la enzima NADPH oxidasa en promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y que el aumento de AngII también estimula la producción de ROS estimulando la actividad de esta enzima. Debido a esto se evaluó la producción de anión superóxido inducida por NADPH, estimando así la actividad de la enzima NADPH oxidasa, principal fuente de especies reactivas del oxígeno, en el ventrículo izquierdo.

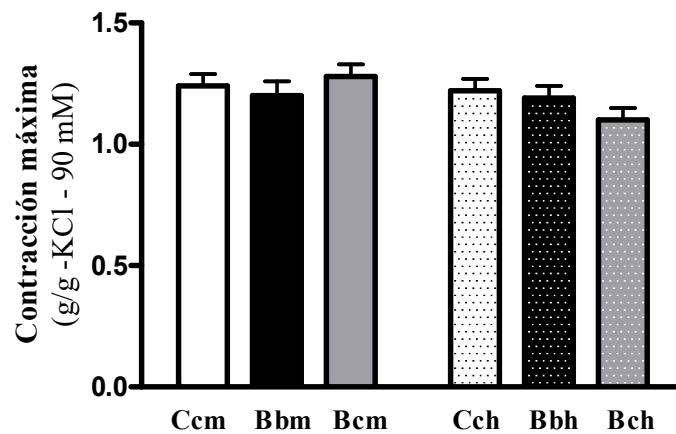
En la **figura 5.19** observamos que la producción de anión superóxido inducida por NADPH fue mayor en los machos que tuvieron restricción dietaria de zinc durante toda su vida. No se observaron diferencias en el grupo Bcm ni en los grupos de hembras.



**Figura 5.19. Producción de anión superóxido inducido por NADPH oxidasa.** ABC: área bajo la curva. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM,  $n=6$  por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p<0,05$  vs Ccm;  $^{\gamma}p<0,05$  vs Ccm.

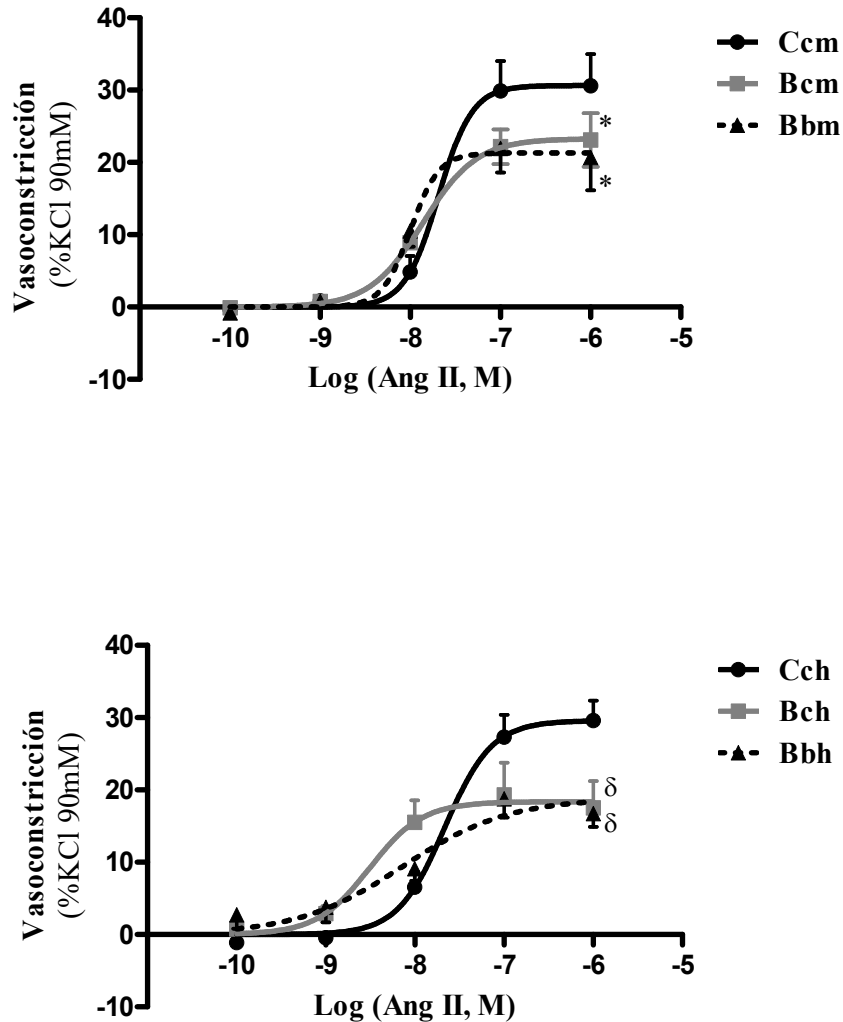
### 5.1.9 Estudios de reactividad vascular en anillos de aorta torácica de ratas de 81 días de vida

Se estudió la respuesta vasoconstrictora frente al KCl (90mM) y a la AngII en anillos de aorta torácica con endotelio intacto mediante el agregado de concentraciones crecientes de Ang II al baño de órgano aislado. La AngII ejerce su acción vasoconstrictora en las células del músculo liso vascular a través de los receptores AT<sub>1</sub> acoplados a la proteína Gq, que a su vez activa un mecanismo dependiente de IP<sub>3</sub> que conduce a un aumento en los niveles de calcio intracelular y a la contracción. En la **figura 5.20** se muestra la respuesta alcanzada frente a la solución de Krebs enriquecida en KCl 90 mM, la cual fue utilizada como control para evaluar la capacidad contráctil del músculo liso vascular. El KCl actúa de manera inespecífica despolarizando la membrana celular, dando lugar a la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales.



**Figura 5.20.** Contracción máxima alcanzada con KCl (90mM) en anillos de aorta torácica de crías de 81 días. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM; n=10 por grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples.

En la **figura 5.21** se muestran las curvas concentración-respuesta frente a AngII en anillos de aorta. Las crías que tuvieron una restricción de zinc durante algún periodo de su vida, tanto machos como hembras, tuvieron menor contracción máxima respecto a los controles. No se observaron cambios en la potencia de la AngII, estimada por el logaritmo negativo de la concentración molar requerida para alcanzar el 50% de la respuesta máxima (pCE50) (**tabla 5.7**).



**Figura 5.21.** Respuesta vasoconstrictora frente a la Ang II en anillos de aorta torácica de crías de crías de 81 días. Las curvas concentración-respuesta muestran la constricción inducida por la AngII en anillos de aorta con endotelio de ratas macho (A) y hembras (B). Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM y fueron analizados con ANOVA, seguido del test a posteriori Bonferroni; n=10 por grupo. \*p<0,05 vs Ccm;  $\delta$ p<0,05 vs Cch

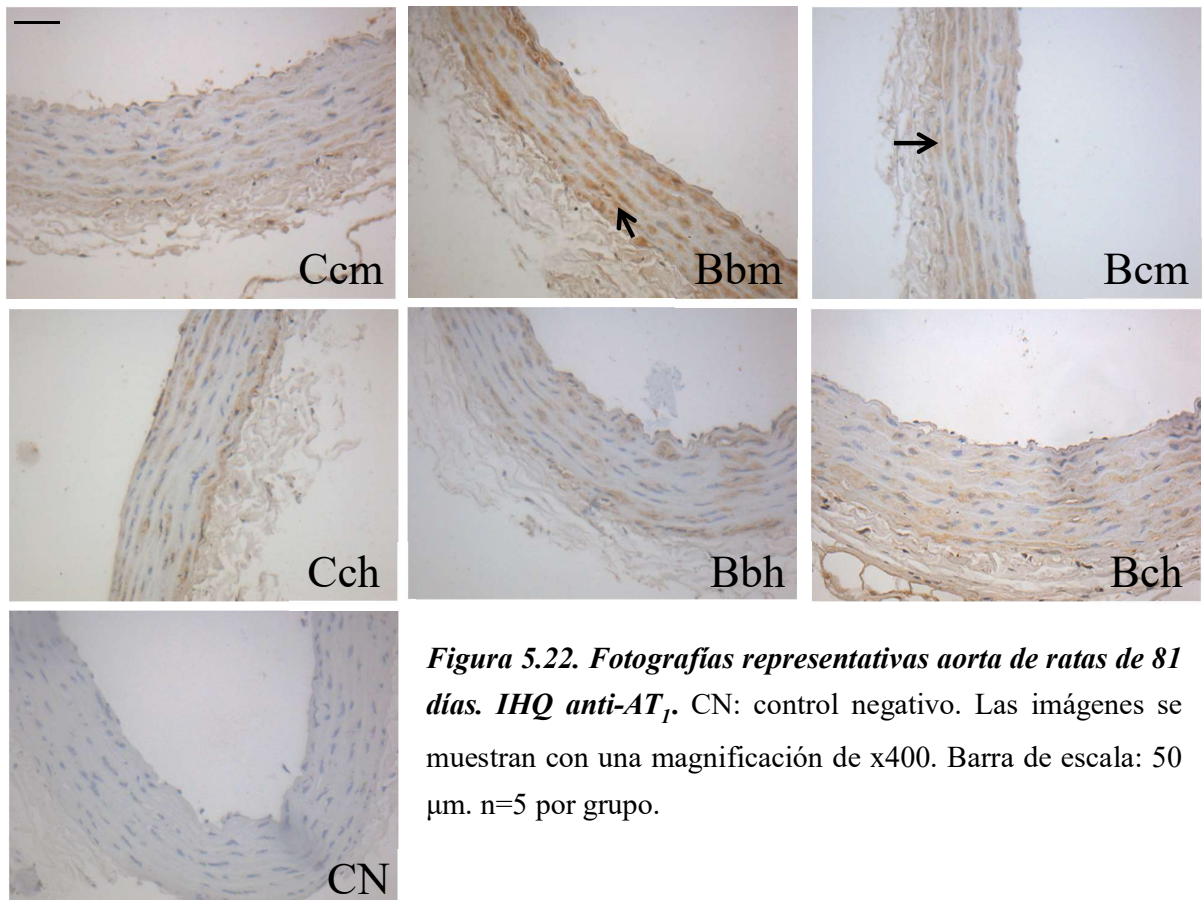
	<b>Ccm</b>	<b>Bbm</b>	<b>Bcm</b>	<b>Cch</b>	<b>Bbh</b>	<b>Bch</b>
<b>Rmax (%)</b>	30,6±2,9	21,3±2,2*	23,3± 1,9*	29,6±2,3	18,9±2,1 <sup>δ</sup>	18,4±2,6 <sup>δ</sup>
<b>pCE50</b>	7,69±0,34	7,99±0,10	7,86±0,14	7,67±0,15	8,13±0,32	8,51±0,28

**Tabla 5.7. Respuesta vasoconstrictora frente a la Ang II en anillos de aorta torácica de crías de 81 días.** Rmax (%): máxima respuesta de contracción a la AngII normalizada respecto a la máxima contracción obtenida mediante el agregado de KCl. pCE50: logaritmo negativo de la concentración molar requerida para alcanzar el 50% de la R<sub>máx</sub>. Los valores son expresados como la media ± EEM, n=10 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm; <sup>δ</sup>p<0,05 vs Cch.

### IHQ de receptores AT<sub>1</sub> en aorta torácica

Dados los resultados presentados en este estudio sobre la contracción de la aorta frente a la AngII, se evaluaron los niveles del receptor AT<sub>1</sub> por IHQ debido al papel que ejercen sobre el control del tono vascular. Las ratas machos que tuvieron restricción de zinc presentaron mayores niveles de área marcada del receptor AT<sub>1</sub> respecto al control (Ccm: 25,2±1,5; Bbm: 36,9±2,1\*; Bcm: 31,1±1,8\*, p<0,05 vs Ccm. % área marcada/ área total de tejido). No se encontraron diferencias significativas entre las hembras (Cch: 22,1±2,1; Bbh: 26,7±3,5; Bch: 26,1±3,2, % área marcada/ área total de tejido).

En la **figura 5.22** se muestran fotografías representativas de los anillos aórticos donde se observa, en músculo liso, la inmunomarcación correspondiente al receptor AT<sub>1</sub>.



**Figura 5.22.** Fotografías representativas aorta de ratas de 81 días. IHQ anti-AT<sub>1</sub>. CN: control negativo. Las imágenes se muestran con una magnificación de x400. Barra de escala: 50  $\mu$ m. n=5 por grupo.



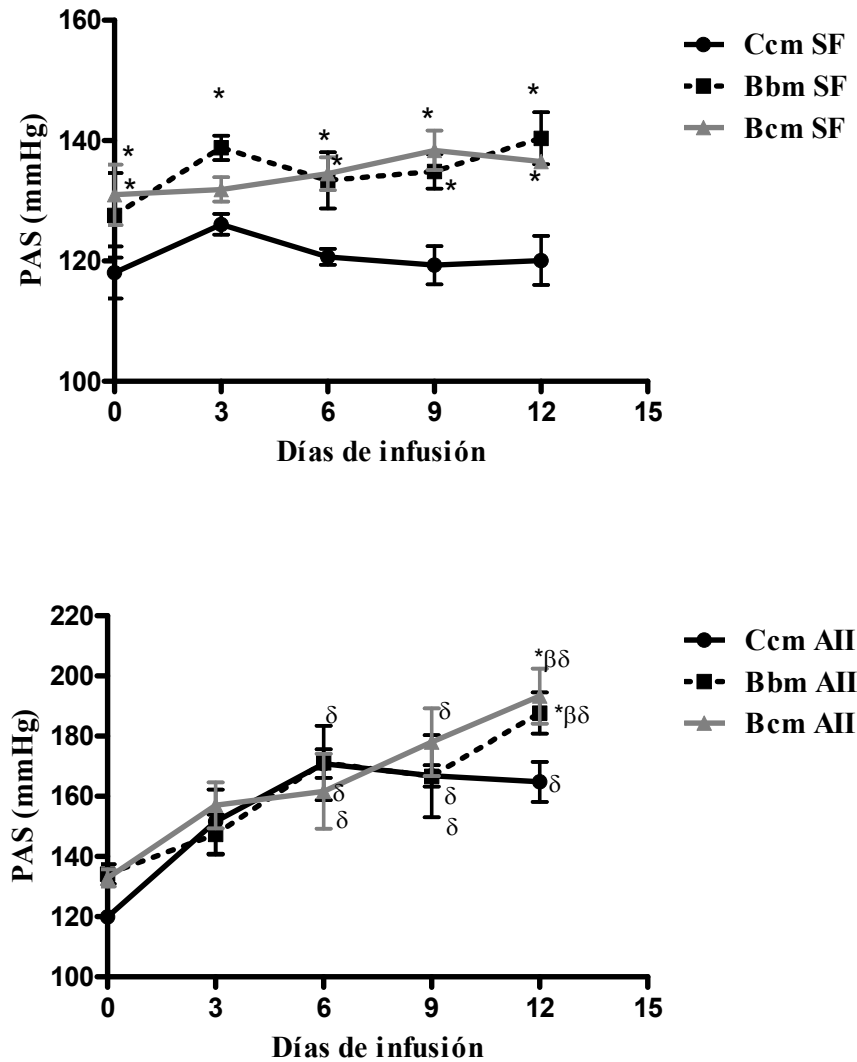
## 5.2 RESULTADOS: PROTOCOLO II

### Estudio de los efectos de la infusión crónica de AngII sobre el sistema cardiovascular y renal en los animales adultos machos expuestos a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y el crecimiento

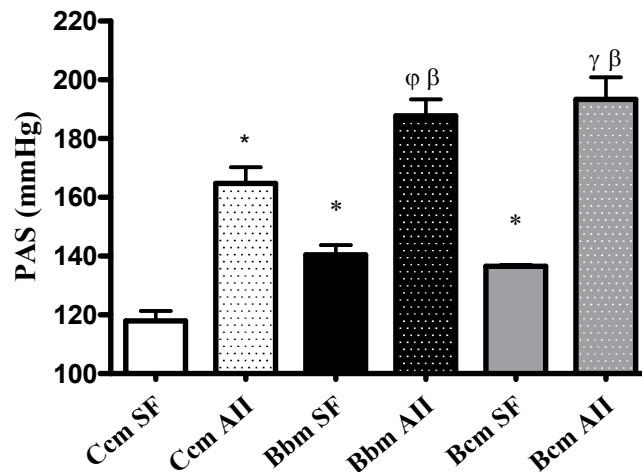
La restricción dietaria de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o la adultez, indujo un aumento de la PAS y cambios en los componentes del SRA cardiovascular y renal principalmente en ratas macho (Bbm y Bcm). Es por ello que decidimos evaluar los efectos cardiovasculares y renales de la activación del SRA sistémico en ratas macho sometidas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento postdestete mediante una infusión crónica de AngII.

#### 5.2.1 Registro de la presión arterial sistólica

El día previo a la implantación de la bomba osmótica y cada 3 días durante todo el periodo experimental, se registró la PAS mediante la técnica de *tail-cuff*. La **figura 5.23.A** muestra la PAS en los grupos tratados con SF (solución fisiológica, vehículo). Se observa que los valores de PA fueron mayores en los grupos Bbm SF y Bcm SF respecto a Ccm SF en todos los tiempos experimentales estudiados. En la **figura 5.23.B** se observan los valores de PAS de los grupos tratados con AngII durante los 14 días. Los tres grupos experimentales mostraron un aumento paulatino de la PAS a partir del día 6 de la infusión con AngII. La **figura 5.24** muestra los valores de PAS al final del tratamiento en los 6 grupos experimentales. Si bien en todos los grupos la AngII indujo un aumento en la PA, los animales Bbm AngII y Bcm AngII alcanzaron valores de PAS mayores que los animales Ccm AngII (Bbm AngII: 23 mmHg y Bcm AngII: 28 mmHg vs Ccm AngII). Por otra parte, las ratas Ccm, Bbm, Bcm tratados con AngII presentaron mayores niveles de PAS que los respectivos grupos tratados con SF.



**Figura 5.23. Efecto de la deficiencia de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre la presión arterial sistólica (PAS) en respuesta a la infusión crónica de AngII. A. Ratas macho que recibieron infusión subcutánea de NaCl 0,9% (SF), B. Ratas macho que recibieron infusión subcutánea de AngII (AII).** PAS: presión arterial sistólica. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p < 0,05$  vs Ccm SF, Ccm AII;  $^{\beta}p < 0,05$  vs día 3, día 6.  $^{\delta}p < 0,05$  vs día 0.



**Figura 5.24. Presión arterial sistólica al final del protocolo de la infusión crónica con Ang II o NaCl 0,9%.** Los valores son expresados como la media  $\pm$  SEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm SF; <sup>β</sup>p<0,05 vs Ccm AII; <sup>φ</sup>p<0,001 vs Bbm SF; <sup>γ</sup>p<0,001 vs Bcm SF.

### 5.2.2 Evaluación de la morfología y el estado inflamatorio en tejido renal

Al finalizar el protocolo de infusión subcutánea con AngII o SF (día 14), los animales fueron sacrificados y se les extrajeron rápidamente los riñones, el corazón y la porción descendente de la aorta torácica para evaluar parámetros histológicos y el estado inflamatorio mediante la cuantificación de dos importantes marcadores: Interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).

#### Evaluación del colágeno perivascular y la morfología de arterias renales

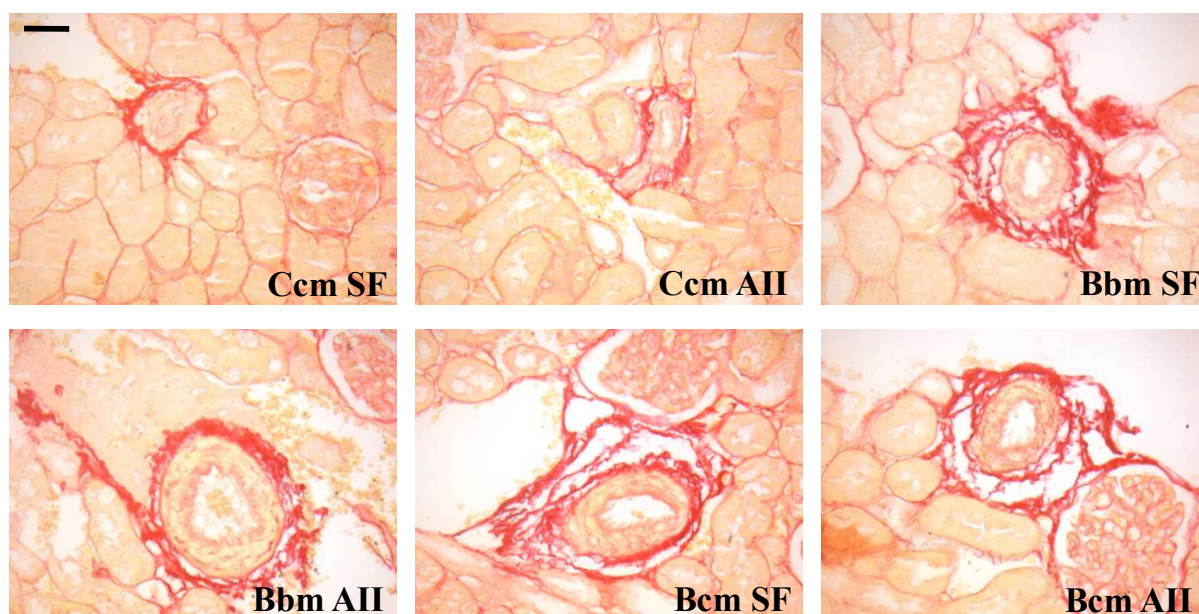
Mediante la técnica de Sirius red se evaluó el colágeno tipo I y III de las arterias intraparenquimales del tejido renal. Las ratas que tuvieron una deficiencia de zinc durante toda su vida, así como también aquellas que sólo tuvieron deficiencia durante la vida fetal y la lactancia, presentaron un aumento en el colágeno perivascular en este tejido. El tratamiento con AngII no modificó este parámetro en el grupo control ni

exacerbó los cambios inducidos por la deficiencia de zinc en los animales Bbm AII y Bcm AII (**tabla 5.8**).

En cuanto a la existencia de un remodelado vascular en las arterias renales, la deficiencia de zinc indujo un aumento significativo en la relación entre el área de la media y el área de la luz únicamente en las ratas Bcm SF. El tratamiento con AngII sólo modificó los parámetros morfométricos de las arterias renales de las ratas Ccm, que presentaron un aumento en la relación media/luz, acompañado de una menor área de la luz normalizada por el área total vascular (**tabla 5.8, figura 5.25**).

	Ccm SF	Ccm AII	Bbm SF	Bbm AII	Bcm SF	Bcm AII
AC/AL	8,6±0,4	9,9±0,5	11,7±0,9*	13,2±0,4	13,8±0,8*	12,5±0,8
AM/AL	3,94±0,24	5,42±0,21*	4,82±0,36*	4,42±0,38	5,38±0,29*	4,92±0,24
AL/ATV	0,22±0,01	0,17±0,01*	0,20±0,01	0,21±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01

**Tabla 5.8: Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre el remodelado de arterias renales en respuesta a la infusión crónica de AngII.** AC: área de colágeno, AL: área de la luz, AM: área de la capa media, ATV: área total del vaso. Los valores son expresados como la media ± EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm SF.



**Figura 5.25.** Fotografías representativas de la vasculatura de tejido renal (tinción de Sirius red) Las imágenes se muestran con una magnificación de  $\times 400$ . Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ .  $n=6$  por grupo.

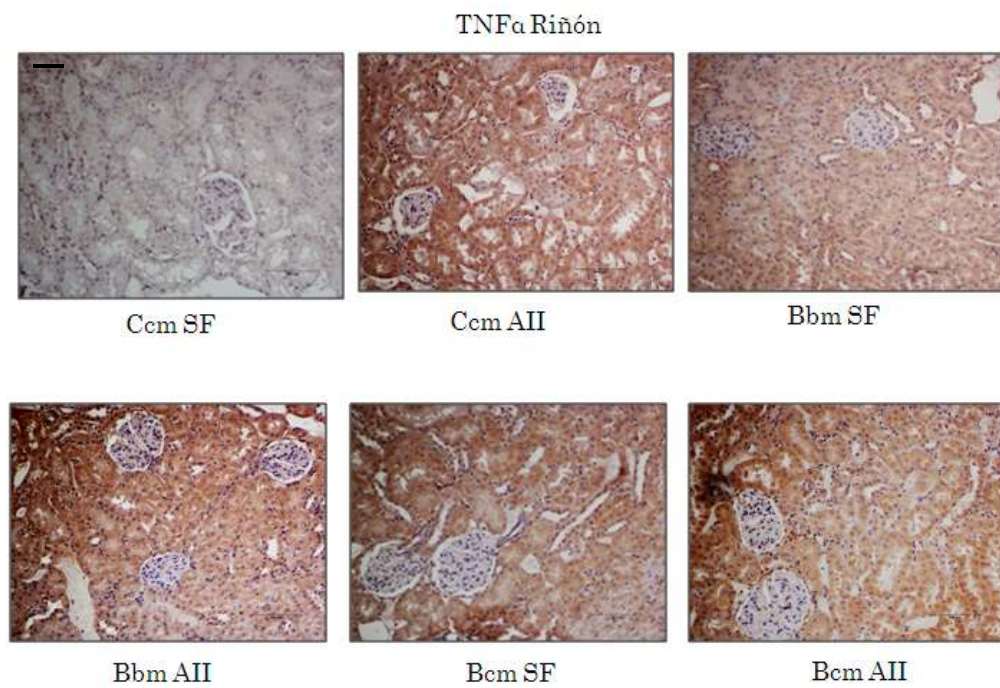
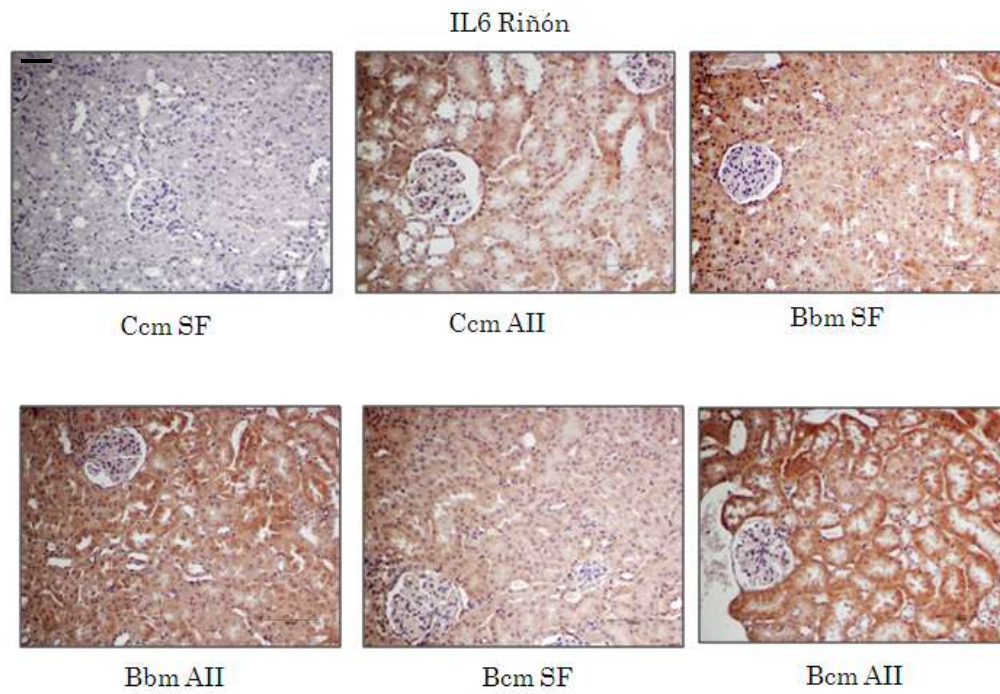
#### Evaluación de IL-6 y TNF- $\alpha$ en tejido renal

Mediante IHQ se midieron dos importantes citoquinas proinflamatorias: IL-6 y TNF- $\alpha$ . La deficiencia de zinc produjo un incremento de las citoquinas proinflamatorias tanto en los animales Bbm SF como en Bcm SF. La infusión crónica con AngII incrementó la inmunomarcación de ambas citoquinas en todos los grupos. Sin embargo, este incremento fue menor en los animales Bbm AII y Bcm AII respecto a Ccm AII dado que las ratas deficientes en zinc presentaban un estado inflamatorio basal exacerbado (tabla 5.9). La figura 5.26 muestra fotografías representativas de la inmunomarcación obtenida para ambos marcadores en tejido renal.

	Ccm SF	Ccm AII	Bbm SF	Bbm AII	Bcm SF	Bcm AII
<b>IL-6 %/área</b>	4,0 $\pm$ 1,3	20,8 $\pm$ 3,1*	19,6 $\pm$ 2,2*	25,4 $\pm$ 1,6 <sup>o</sup>	20,0 $\pm$ 1,9*	24,0 $\pm$ 2,2 <sup>y</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math> %/área</b>	5,0 $\pm$ 0,8	21,7 $\pm$ 2,4*	20,2 $\pm$ 2,2*	24,4 $\pm$ 2,1 <sup>o</sup>	20,3 $\pm$ 1,8*	23,4 $\pm$ 2,0 <sup>y</sup>

**Tabla 5.9.** Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre los marcadores proinflamatorios en tejido renal en respuesta a la infusión crónica de AngII. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM,  $n=6$  por grupo.

Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p < 0,001$  vs Ccm SF; <sup>o</sup> $p < 0,05$  vs Bbm SF; <sup>γ</sup> $p < 0,05$  vs Bcm SF.



**Figura 5.26. Fotografías representativas de la inmunorreacción anti-IL-6 y anti-TNF- $\alpha$  en tejido renal.** Las imágenes se muestran con una magnificación de  $\times 400$ . Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=6$  por grupo

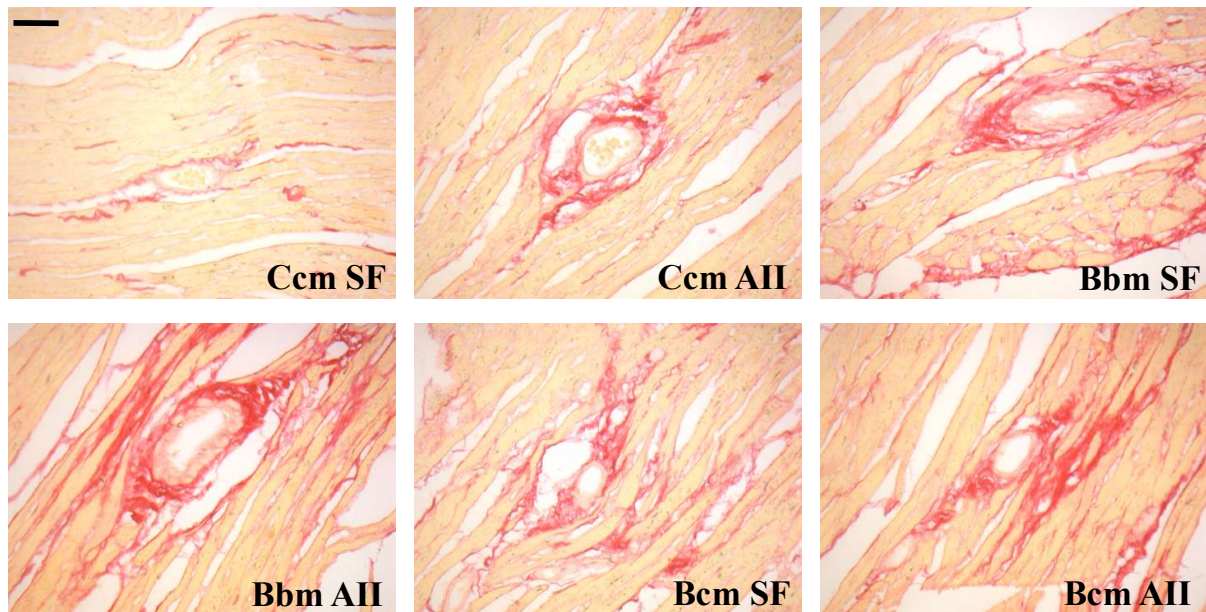
### 5.2.3 Evaluación de la morfología y el estado inflamatorio en tejido cardíaco

#### Evaluación del colágeno perivascular y la morfología de arterias coronarias

Mediante la técnica de Sirius red se evaluó el colágeno tipo I y III de arterias del ventrículo izquierdo. La deficiencia de zinc durante el desarrollo fetal, la lactancia y/o el crecimiento post-destete indujo un aumento en el colágeno perivascular del ventrículo izquierdo. La infusión crónica con AngII incrementó el área de colágeno perivascular solamente en el grupo Ccm AII (**tabla 5.10**). Por otro lado, sólo las crías Bbm SF presentaron un incremento en el área de la capa media vascular. No se observaron diferencias significativas en el área de la luz entre los grupos SF ni con el tratamiento crónico con AngII. La **figura 5.27** muestra fotografías representativas de la tinción con Sirius red de los ventrículos izquierdos.

	Ccm SF	Ccm AII	Bbm SF	Bbm AII	Bcm SF	Bcm AII
AC/AL	1,37 $\pm$ 0,20	2,68 $\pm$ 0,23*	2,71 $\pm$ 0,32*	2,30 $\pm$ 0,66	2,16 $\pm$ 0,18*	2,83 $\pm$ 0,17
AM/AL	1,28 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,07	1,77 $\pm$ 0,21*	1,77 $\pm$ 0,12	1,32 $\pm$ 0,07	1,70 $\pm$ 0,24
AL/ATV	0,41 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,02

**Tabla 5.10: Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre el remodelado de las arterias coronarias en respuesta a la infusión crónica de AngII.** AC: área de colágeno, AL: área de la luz, AM: área de la capa media, ATV: área total del vaso. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM,  $n=6$  por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \* $p<0,05$  vs Ccm SF.



**Figura 5.27.** Fotografías representativas de la vasculatura de ventrículo izquierdo (tinción de *Sirius red*). Las imágenes se muestran con una magnificación de  $\times 400$ . Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ .  $n=6$  por grupo

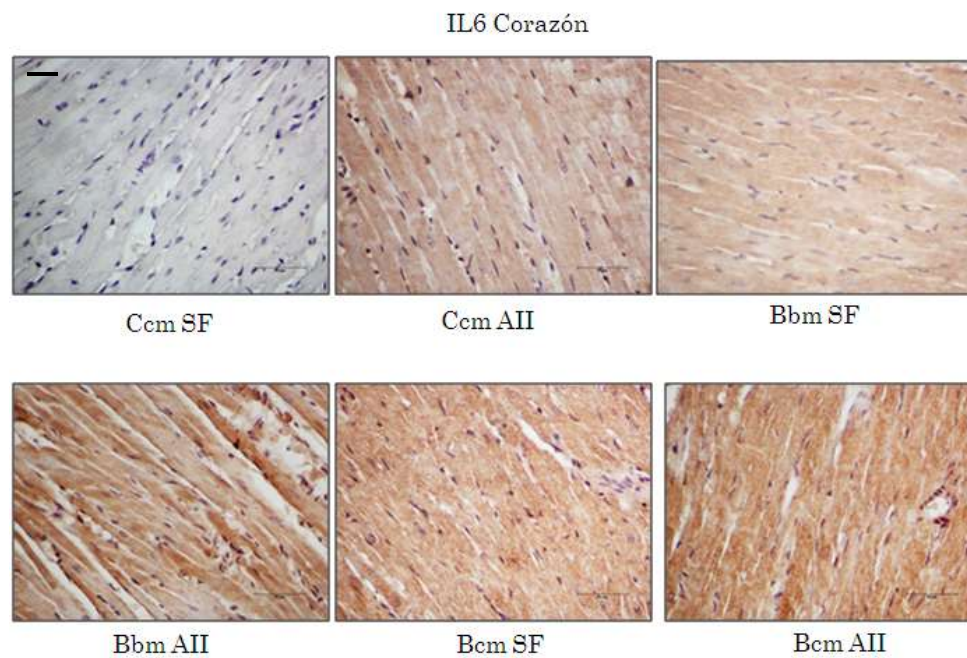
### Evaluación de IL-6 y TNF- $\alpha$ en ventrículo izquierdo

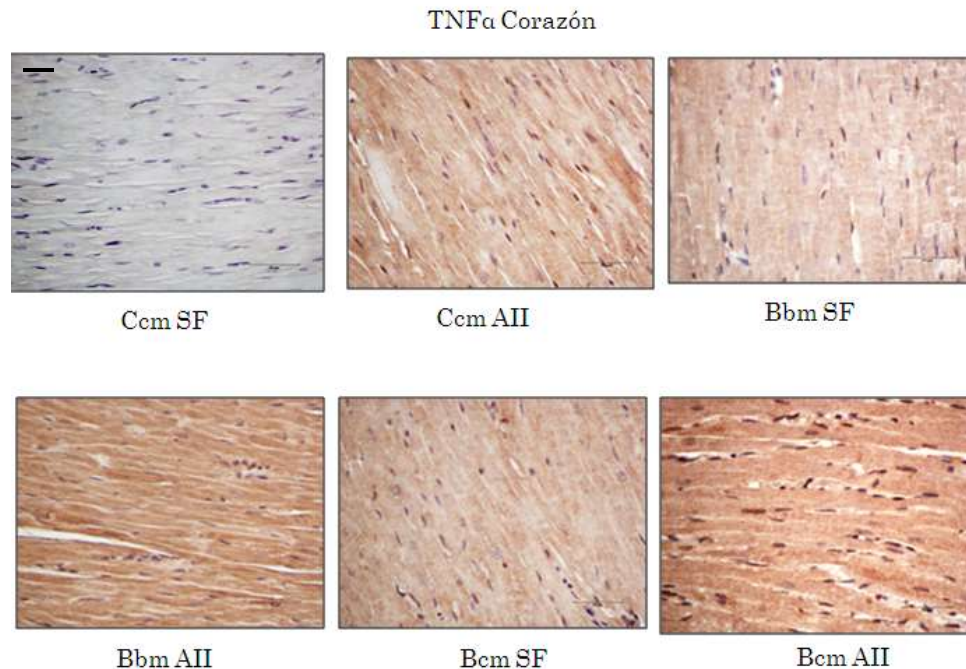
Mediante IHQ se midieron IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los resultados hallados en este tejido fueron similares al de riñón. La deficiencia de zinc produjo un incremento de las citoquinas proinflamatorias tanto en Bbm SF como en Bcm SF. La infusión crónica con AngII provocó un aumento de la inmunomarcación en todos los grupos experimentales. Sin embargo, este incremento fue menor en los animales Bbm AII y Bcm AII respecto a Ccm AII ya que las ratas deficientes en zinc presentaban un estado inflamatorio basal exacerbado sin la infusión de AngII (**tabla 5.11**). La **figura 5.28** muestra fotografías representativas de la inmunomarcación obtenida para ambos marcadores en tejido cardíaco.



	Ccm SF	Ccm AII	Bbm SF	Bbm AII	Bcm SF	Bcm AII
<b>IL6</b> %/área	3,3±1,6	18,1±1,7*	17,3±1,8*	21,0±2,4 <sup>o</sup>	17,5±1,9*	<b>20,5±2,3<sup>γ</sup></b>
<b>TNF-α</b> %/área	3,7±0,9	19,4±2,8*	17,7±1,6*	22,2±1,4 <sup>o</sup>	19,6±0,9*	<b>22,7±2,6<sup>γ</sup></b>

**Tabla 5.11. Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre los marcadores proinflamatorios en tejido cardíaco, en respuesta a la infusión crónica de AngII.** Los valores son expresados como la media ± EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,001 vs Ccm SF; <sup>o</sup>p<0,05 vs Bbm SF; <sup>γ</sup>p<0,05 vs Bcm SF.





**Figura 5.28.** Fotografías representativas de la inmunorreacción anti-IL-6 y anti-TNF- $\alpha$  en tejido cardíaco. Las imágenes se muestran con una magnificación de  $\times 400$ . Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .  $n=6$  por grupo

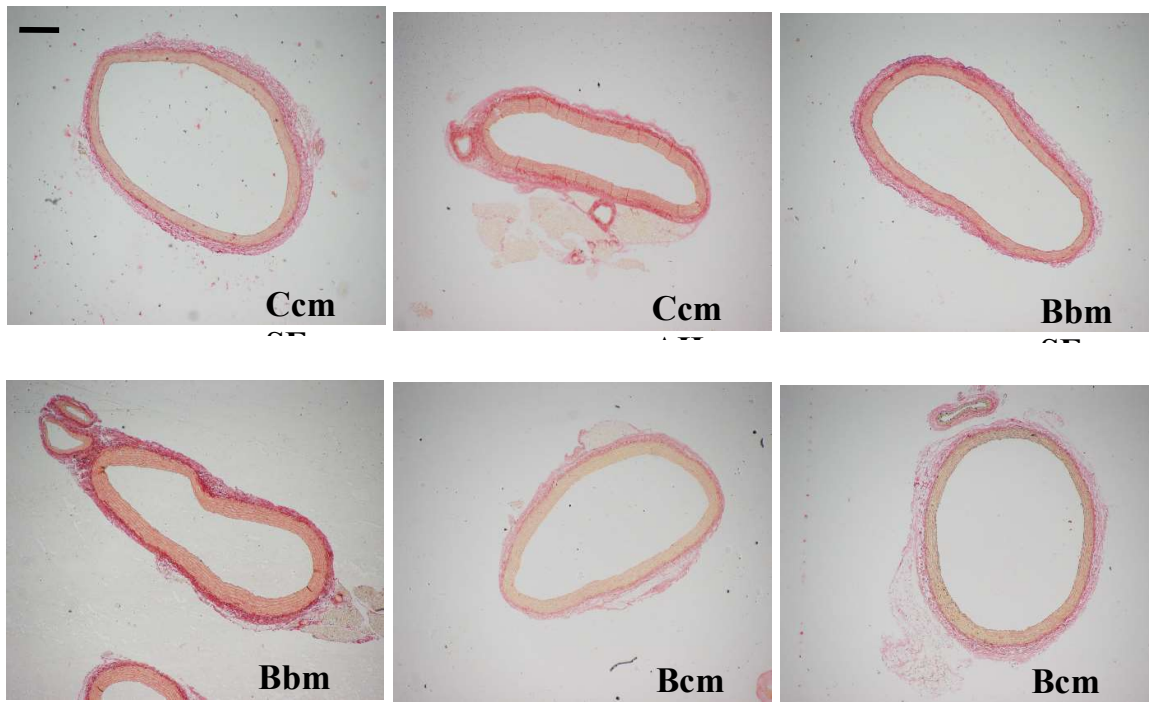
#### 5.2.4 Evaluación de la morfología y el estado inflamatorio en tejido aórtico

##### Evaluación del colágeno perivascular y la morfología de la aorta

Mediante la técnica de Sirius red se evaluó la morfología de la aorta torácica. No se observaron diferencias significativas en los depósitos de colágeno periaórticos entre los grupos estudiados. Sin embargo, los machos con deficiencia de zinc a lo largo de toda su vida tuvieron un incremento en la relación media/luz aórtica. La infusión de AngII produjo un aumento en dicha relación en todos los grupos respecto a los infundidos con SF (**tabla 5.12**). La **figura 5.29** muestra fotografías representativas de la tinción con Sirius red de las aortas.

	Ccm SF	Ccm AII	Bbm SF	Bbm AII	Bcm SF	Bcm AII
AC/AL	0,28±0,07	0,30±0,03	0,27±0,06	0,37±0,03	0,26±0,03	0,34±0,01
AM/AL	0,14±0,02	0,28±0,02*	0,23±0,01*	0,39±0,03 <sup>o</sup>	0,17±0,01	0,31±0,01 <sup>y</sup>

**Tabla 5.12: Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre el remodelado de la aorta en respuesta a la infusión crónica de AngII.** AC: área de colágeno, AL: área de la luz, AM: área de la pared media, ATV: área total del vaso. Los valores son expresados como la media ± EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,05 vs Ccm SF; <sup>o</sup>p<0,05 vs Bbm SF; <sup>y</sup>p<0,05 vs Bcm SF.



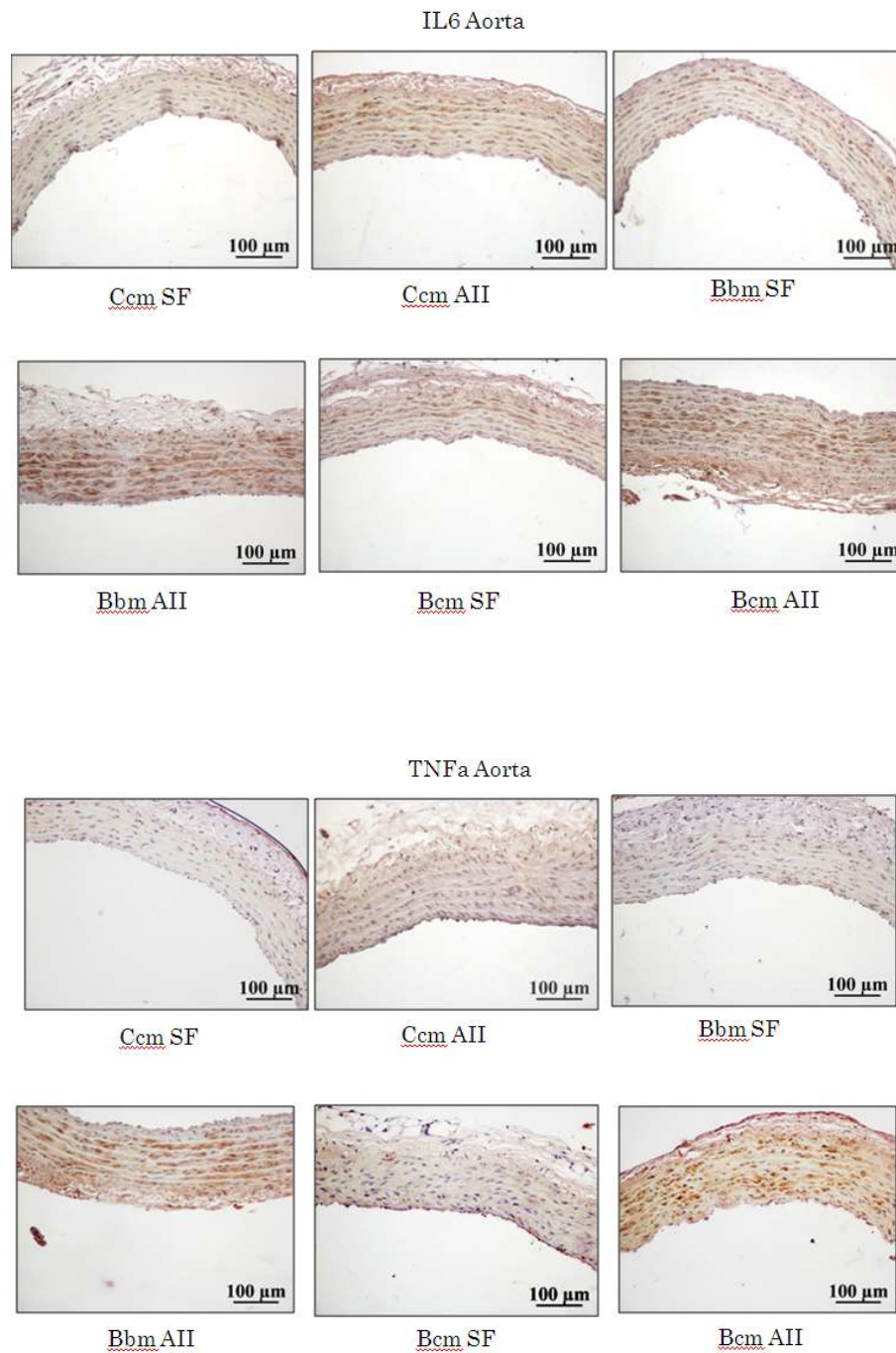
**Figura 5.29. Fotografías representativas de tejido aórtico (tinción de Sirius red)** Las imágenes se muestran con una magnificación de x40. Barra de escala: 500  $\mu$ m. n=6 por grupo.

### Evaluación de IL-6 y TNF- $\alpha$ en aorta torácica

Mediante IHQ se midieron las citoquinas proinflamatorias: IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los resultados hallados en este tejido fueron similares al de riñón y corazón. La deficiencia de zinc produjo un incremento de estas citoquinas tanto en Bbm SF como en Bcm SF. El tratamiento con AII durante 14 días produjo un aumento de ambos marcadores en todos los grupos (**tabla 5.14**). En la **figura 5.30** se observan fotografías representativas de la inmunomarcación con anti-IL6 y anti-TNF- $\alpha$ .

	Ccm SF	Ccm AII	Bbm SF	Bbm AII	Bcm SF	Bcm AII
IL6 %/área	2,1 $\pm$ 0,4	22,3 $\pm$ 2,2*	20,8 $\pm$ 1,6*	31,7 $\pm$ 1,7 <sup>o</sup>	21,4 $\pm$ 1,9*	30,4 $\pm$ 1,6 <sup>y</sup>
TNF $\alpha$ %/área	1,5 $\pm$ 0,5	17,0 $\pm$ 1,9*	15,7 $\pm$ 1,7*	30,6 $\pm$ 2,0 <sup>o</sup>	15,4 $\pm$ 1,6*	31,2 $\pm$ 2,3 <sup>y</sup>

**Tabla 5.14. Efecto de la deficiencia moderada de zinc durante la vida prenatal y postnatal sobre los marcadores proinflamatorios en tejido cardíaco, en respuesta a la infusión crónica de AngII.** Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM, n=6 por grupo. Los datos fueron analizados usando ANOVA de 2 factores, seguido del test a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. \*p<0,001 vs Ccm SF; <sup>o</sup>p<0,05 vs Bbm SF; <sup>y</sup>p<0,05 vs Bcm SF.



**Figura 5.30.** Fotografías representativas de la inmunorreacción anti-IL-6 y anti-TNF- $\alpha$  en tejido aórtico.

## 5.3 RESUMEN DE RESULTADOS

### PROTOCOLO I

#### En las ratas madres:

- El peso corporal de las ratas MB y MC fueron similares en todos los periodos evaluados.
- El consumo de alimento fue similar en ambos grupos de madre durante la preñez y la lactancia.
- Las concentraciones de zinc séricas al final de la gestación fueron menor en las MB.

#### En las crías, a los 6 días de vida:

- Las crías Bm y Bh presentaron un menor peso corporal respecto de Cm y Ch, respectivamente.
- La longitud de la tibia fue similar en todos los grupos.
- La concentración de zinc sérica fue menor en las crías Bm y Bh respecto a Cm y Ch, respectivamente.

#### En tejido renal:

- El peso del riñón referido al peso corporal fue menor en las crías Bm y Bh respecto a Cm y Ch, respectivamente.
- El área glomerular y el área capilar glomerular fue menor en las crías Bm respecto a Cm.
- El número de células apoptóticas fue mayor en las crías Bm.
- El contenido de AngII renal, así como también la relación AngII/Ang-(1-7) fue mayor en Bm respecto a Cm. No hubo diferencias significativas en el contenido de Ang-(1-7). No hubo diferencias entre las hembras.
- El aumento de los niveles de AngII en el grupo Bm fue confirmado mediante la técnica de IHQ.

- Los niveles de ARNm y proteicos de ECA fue mayor en el grupo Bm. Las crías hembras presentaron menores niveles del ARNm de ECA2 respecto de las crías macho.
- Los niveles de ARNm y proteicos del receptor AT<sub>1</sub> se encontraron elevados en las crías Bm respecto a Cm.
- El aumento de los niveles del receptor AT<sub>1</sub> en las crías Bm fue confirmado mediante la técnica de IHQ.
- Los niveles de ARNm del receptor AT<sub>2</sub> fueron mayores en Ch respecto a Bh, mientras que los niveles proteicos de AT<sub>2</sub> fueron similares entre Ch y Bh. El grupo Bm presentó mayores niveles proteicos del receptor AT<sub>2</sub> que el grupo Cm.

#### **En las crías, a los 81 días de vida:**

- La PAS aumentó en todos los grupos experimentales entre los 36 y los 51 días de vida. Sin embargo, los valores de PAS continuaron incrementándose hasta los 81 días únicamente en las crías Bbm y Bcm, alcanzando PAS mayores a 140 mmHg. Por otro lado, no se observaron diferencias en los valores de PAS entre los grupos experimentales de hembras en ninguno de los tiempos experimentales estudiados.
- Las ratas de ambos sexos Bb y Bc presentaron menores pesos corporales y longitudes de tibia en comparación con las Cc. Bbm y Bbh presentaron menores concentraciones séricas de zinc que Ccm y Cch, respectivamente.

#### **En tejido renal (corteza renal)**

- Las crías Bb y Bc de ambos sexos presentaron menores pesos renales referidos a la longitud de la tibia que sus controles.
- El contenido de AngII fue mayor en los machos Bbm y Bcm respecto a Ccm. No se encontraron diferencias en los niveles de Ang-(1-7) entre los grupos experimentales. Sin embargo, la relación AngII/Ang-(1-7) fue mayor en las crías macho Bbm y Bcm. Mientras que en las crías hembras dicha relación se encontró disminuida.
- El aumento de los niveles AngII en las crías Bbm y Bcm fue confirmado mediante la técnica de IHQ.

- Los niveles del ARNm de ECA fue similar en todos los grupos estudiados. Mientras que los niveles del ARNm de ECA2 fue significativamente mayor en todos los grupos de las crías hembras.
- Los niveles del ARNm y proteicos del receptor AT<sub>1</sub> fue mayor en Bbm y Bcm, respecto al control. No se encontraron diferencias en las crías hembras. Los niveles del ARNm y proteicos del receptor AT<sub>2</sub> fueron similares en todos los grupos.
- El aumento de los niveles del receptor AT<sub>1</sub> en las crías Bbm y Bcm fue confirmado mediante la técnica de IHQ.

#### **En tejido cardíaco (Ventrículo izquierdo)**

- Bb y Bc de ambos sexos presentaron menor peso cardíaco y del VI respecto a Cc. Sólo los machos presentaron menor peso del ventrículo derecho respecto a Ccm.
- El contenido en VI de AngII fue mayor en las crías Bbm. No se hallaron diferencias significativas en cuanto al contenido de Ang-(1-7) entre los grupos evaluados. Sin embargo, la relación AngII/Ang-(1-7) se encontró incrementada en los grupos Bbm y Bbh.
- Los niveles del ARNm de ECA y ECA2 fueron similares en todos los grupos evaluados.
- Los grupos Bbm y Bcm presentaron mayores niveles de ARNm y proteico del receptor AT<sub>1</sub>. No se encontraron diferencias significativas al evaluar los niveles del receptor AT<sub>2</sub>.
- La producción de anión superóxido inducida por la NADPH oxidasa se encontró incrementada sólo en las crías Bbm.

#### **En aorta**

- Los machos Bb y Bc presentaron niveles mayores de AT1 en aorta, medidos por IHQ. Entre las hembras no se hallaron diferencias.
- En estudios de baño de órgano aislado medimos la respuesta contráctil frente a AngII. Las crías que tuvieron deficiencia de zinc en algún momento de su vida, de ambos sexos, presentaron menor respuesta vasoconstrictora respecto a las crías controles.



## PROTOCOLO II

- Las crías Bbm y Bcm infundidas con SF presentaron valores de PAS cercanos a 140mmHg que fueron constantes a lo largo de todo el protocolo experimental.
- Todas las crías que tuvieron tratamiento crónico con AngII presentaron un incremento en la PAS. A partir del día 6 de tratamiento, las crías Bbm y Bcm con AngII presentaron mayores valores de PAS respecto de las crías Ccm con AngII. Los valores fueron en aumento en todos los grupos experimentales hasta el final del protocolo.

### **En tejido renal:**

- Bbm y Bcm infundidos con SF presentaron un incremento en el colágeno perivascular y de la pared media vascular.
- El tratamiento crónico con AngII indujo un incremento en la pared media vascular y una reducción de la luz del vaso sólo en Ccm.
- Los grupos Bbm y Bcm infundidos con SF presentaron un importante incremento de citoquinas: IL-6 y TNF- $\alpha$ .
- El tratamiento crónico con AngII produjo un aumento de las citoquinas proinflamatorias en todos los grupos, observando mayores valores en los grupos Bbm y Bcm respecto a Ccm.

### **En tejido cardíaco:**

- Los animales Bbm SF y Bcm SF presentaron mayores valores de colágeno perivascular. A su vez, en Bbm SF se observó un incremento de la pared media vascular.
- El tratamiento con AngII indujo un incremento del colágeno perivascular sólo en Ccm.
- Los grupos Bbm y Bcm infundidos con SF presentaron un importante incremento de citoquinas: IL-6 y TNF- $\alpha$ .
- El tratamiento crónico con AngII produjo un aumento de las citoquinas proinflamatorias en todos los grupos, observando mayores valores en los grupos Bbm y Bcm respecto a Ccm.

**En aorta:**

- En Bbm SF se observó un incremento de la pared media vascular. No se observaron diferencias significativas en los valores de colágeno perivascular.
- En todos los grupos tratados con AngII se observó un incremento de la pared media vascular.
- Los grupos Bbm y Bcm infundidos con SF presentaron un importante incremento de citoquinas: IL-6 y TNF- $\alpha$ .
- El tratamiento crónico con AngII produjo un aumento de las citoquinas proinflamatorias en todos los grupos, observando mayores valores en los grupos Bbm y Bcm respecto a Ccm.

## **6. DISCUSIÓN**

La HTA es uno de los factores de riesgo más prevalentes que contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales. La importante asociación entre los niveles elevados de presión arterial y el desarrollo de insuficiencia renal, infarto agudo de miocardio y accidentes cerebrovasculares, posiciona a la HTA como una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad. El estudio de los factores involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la HTA resultan de suma importancia para la prevención y el control de la misma.

Múltiples estudios han demostrado que una dieta desbalanceada por el consumo de alimentos ricos en sal, grasas y glúcidos y pobres en micronutrientes y fibra puede contribuir al desarrollo enfermedades cardiovasculares, metabólicas y renales<sup>198,199</sup>. La carencia de micronutrientes como el zinc es un problema nutricional relevante que afecta a la población, principalmente a niños y embarazadas<sup>279,348</sup>.

En nuestro laboratorio previamente hemos demostrado que la deficiencia moderada de zinc durante el crecimiento intrauterino y postnatal en ratas induce un retraso en el crecimiento y programa el desarrollo de alteraciones morfológicas y funcionales de los sistemas cardiovascular y renal en la vida adulta. A su vez, las ratas deficientes de ambos sexos presentan una menor actividad del sistema del óxido nítrico y un aumento del estrés oxidativo en tejidos relacionados con la regulación de la presión arterial, como lo son el corazón, el sistema vascular y los riñones. Estas alteraciones están presentes tanto en etapas tempranas como en la adultez. Sin embargo, los efectos deletéreos morfológicos y funcionales son más evidentes en las ratas macho, que a su vez presentan HTA en la adultez<sup>325,328-330</sup>.

El presente trabajo de tesis tuvo como principal hallazgo que las alteraciones observadas podrían relacionarse, al menos en parte, con un desbalance en la expresión de los componentes del SRA en el tejido cardiovascular y renal, con predominio de la vía vasoconstrictora dada por ECA/AngII/AT<sub>1</sub>. Observamos asimismo que los cambios en el SRA tisular fueron más acentuados en las ratas macho respecto de las hembras. Nuestras observaciones refuerzan la susceptibilidad de estos animales a la deficiencia nutricional de este micronutriente. Los resultados de este trabajo nos permiten inferir la importancia de un correcto aporte nutricional en madres gestantes, así como en lactantes, a fines de disminuir los riesgos que conlleva la programación fetal y perinatal.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis muestran que las crías de ambos sexos expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y

postnatal presentan un crecimiento restringido, evidenciado por un menor peso corporal a los 6 días de vida, así como por una disminución del peso corporal y el largo de la tibia a los 81 días de vida. Además, esto no pudo ser revertido por la administración de una dieta con contenido adecuado de zinc durante el crecimiento posdestete, ya que los animales Bcm adultos presentaron también un menor peso corporal acompañado de una menor longitud de la tibia. En este sentido, estudios experimentales y clínicos avalan la hipótesis de programación fetal ya que han demostrado que diferentes injurias durante etapas tempranas del desarrollo se asocian con un bajo peso al nacer y la aparición de HTA en la vida adulta <sup>349,350</sup>. Numerosas investigaciones han reportado previamente que el zinc es necesario para la proliferación celular y el crecimiento debido a que muchas de las hormonas y enzimas involucradas en estos procesos dependen de este micronutriente para su funcionamiento y/o síntesis <sup>351,352</sup>. Otros autores han demostrado que el zinc aumenta la expresión del gen que codifica para la timidina kinasa, enzima que se encuentra involucrada en la síntesis de ADN en diferentes tejidos, y que estimula la producción de la hormona de crecimiento y de los factores de crecimiento similares a la insulina <sup>300,301,353,354</sup>. Por otra parte, evidencias clínicas también han demostrado en mujeres embarazadas que los bajos niveles de zinc sérico se correlacionan con un mayor riesgo de tener menor tiempo gestacional y bajo peso al nacer de su descendencia <sup>355</sup>.

Resultados obtenidos y publicados por nuestro grupo de investigación mostraron que ratas macho sometidas a la deficiencia moderada de zinc durante el crecimiento prenatal y postnatal provocó una disminución de la TFG, asociado con una reducción del área de filtración glomerular, una disminución del número de nefrones, una inadecuada actividad del sistema del NO renal y vascular, un aumento del estrés oxidativo y un incremento en el número de células apoptóticas en el riñón a los 81 días de vida <sup>325</sup>.

Teniendo en cuenta el menor crecimiento lineal evidenciado en las ratas con una dieta deficiente, así como las alteraciones morfológicas y funcionales renales observadas previamente en la vida adulta, nos propusimos evaluar los efectos de la restricción de zinc en el desarrollo temprano del riñón al sexto día de vida. La deficiencia moderada de zinc durante el periodo nefrogénico indujo un menor crecimiento en el órgano de ratas de ambos sexos, hecho que se mantuvo en la vida adulta incluso luego de la restitución de zinc en la dieta posdestete. Por otro lado, se observó una disminución de la superficie de filtración glomerular en las crías machos, dado que presentaron una menor área glomerular y/o una menor área capilar de los nefrones yuxtamedulares (más maduros) y de los corticales (menos maduros). En este

sentido, diversos estudios han mostrado que factores ambientales adversos durante la gestación, como la restricción calórica y/o proteica materna, afectan la nefrogénesis y se asocian con riñones más pequeños, menor número de nefronas e HTA en la vida adulta <sup>356</sup>. Asimismo, los resultados se encuentran en línea con estudios previos de nuestro laboratorio en este modelo y con la hipótesis de programación fetal, que postula que una injuria nutricional durante el desarrollo intrauterino puede limitar el crecimiento fetal y conducir a adaptaciones de diferentes tejidos y sistemas. La reducción en el número de unidades funcionales de diversos órganos, tales como el menor número de glomérulos, podría conferir un beneficio adaptativo para la supervivencia a corto plazo frente a esta injuria nutricional, dado que se priorizaría el desarrollo de otros órganos más importantes, pero que a largo plazo predispone al desarrollo de enfermedades en la vida adulta <sup>223,273,325,326,357,358</sup>.

Por otro lado, la menor superficie de filtrado observada en las ratas macho de 6 días de vida con restricción de zinc se acompañó de un mayor número de células apoptóticas en la corteza renal. La menor biodisponibilidad de zinc en el tejido renal podría favorecer los procesos apoptóticos. Se ha descrito, en experimentos *in vitro*, que el zinc puede regular este proceso dada sus propiedades antioxidantes e inhibitoras de la actividad de enzimas proapoptóticas como las caspasas 3, 6, y 9, y las endonucleasas calcio-magnesio dependientes, responsables de la fragmentación apoptótica del ADN <sup>359-361</sup>. Así, la restricción de zinc induciría un desbalance entre los procesos apoptóticos y proliferativos, afectando negativamente los procesos de hiperplasia e hipertrofia glomerular durante la nefrogénesis, conduciendo a los cambios morfológicos renales observados en este modelo. En este sentido, previamente hemos demostrado que, a los 21 días de vida, cuando el proceso nefrogénico ha finalizado, las ratas expuestas a esta deficiencia mostraron un menor número de glomérulos <sup>326</sup>, que en la adultez se acompañó de una mayor apoptosis y reducción en la TFG <sup>325</sup>. Otros modelos de programación fetal por restricción proteica o insuficiencia placentaria demostraron también una disminución en la expresión de factores anti-apoptóticos como Bcl2 y Pax-2, y un aumento de los pro-apoptóticos como p53, Bax y caspasa-3 en el riñón, acompañado de un menor número de glomérulos <sup>223,226</sup>.

Otro aspecto a evaluar respecto de la morfología renal es la fibrosis. En estudios anteriores de nuestro grupo demostramos que los animales adultos expuestos a la deficiencia de zinc durante el desarrollo fetal, la lactancia y el crecimiento mostraban signos de fibrosis en la corteza y médula renal <sup>273</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo no encontramos fibrosis renal en etapas tempranas del desarrollo. Sugerimos que las

ratas de 6 días de vida son muy jóvenes para desarrollar y evidenciar un proceso crónico multifactorial como es la fibrosis <sup>362</sup>.

Evidencia clínica y experimental muestra que el SRA tiene un rol clave en el desarrollo renal <sup>363</sup>. En roedores, comienza a los 12 días, durante el crecimiento intrauterino, y culmina entre el día 10 y 15 después del nacimiento <sup>365</sup>. Todos los componentes del SRA están presentes en el riñón durante su desarrollo y se ha demostrado que juegan un importante papel en la nefrogénesis <sup>169</sup>. La AngII, al interactuar con los receptores AT<sub>1</sub>, media el crecimiento y la proliferación del parénquima renal en formación <sup>176</sup>. Por otro lado, los receptores AT<sub>2</sub> de AngII tienen acciones antiproliferativas y median procesos apoptóticos. El eje no clásico del SRA compuesto por ECA2/Ang-(1-7)/Mas-AT<sub>2</sub> se comporta igual que este último <sup>93,364</sup>. Así, es evidente que el adecuado balance entre los componentes del sistema resulta de suma importancia para el correcto desarrollo renal.

Teniendo en cuenta las alteraciones observadas en las ratas nutricionalmente deficientes a los 6 días de vida, decidimos evaluar el SRA en el momento en el cual el riñón se encuentra en pleno desarrollo. En ratas macho de 6 días, la deficiencia de zinc indujo un aumento de los niveles de AngII que se vio acompañado de un incremento en los niveles de ARNm y proteicos de la ECA y del receptor AT<sub>1</sub>, así como del contenido proteico del receptor AT<sub>2</sub>. Por otro lado, los niveles de Ang-(1-7) fueron similares en todos los grupos, mientras que la relación AngII/Ang-(1-7) se encontró aumentada en las ratas Bm.

Diversos estudios sugieren que las alteraciones tempranas en el SRA intrarrenal juegan un papel clave en la programación fetal y en el condicionamiento del tamaño y la función de dicho órgano. Sin embargo, existen trabajos contradictorios en cuanto a si el SRA es estimulado o inhibido ante una injuria nutricional durante la vida fetal y postnatal temprana <sup>189,196,197,242,251,366-368</sup>. La mayor parte de estos estudios sugieren que ante una injuria durante el periodo nefrogénico existiría una respuesta temporal bifásica en el SRA intrarrenal: inicialmente, en neonatos habría una menor expresión de los componentes de este sistema; posteriormente los niveles se normalizarían llegando luego a una activación inapropiada del SRA, que a largo plazo contribuiría al desarrollo de HTA en la adultez <sup>196</sup>. Por ejemplo, en un modelo de programación por restricción proteica del 9% en ratas, se observaron menores niveles de renina y de AngII renales en las crías recién nacidas <sup>189</sup>. Por otra parte, otros grupos observaron resultados similares con los hallados en el presente trabajo <sup>369,370</sup>. En relación a esto último se ha observado en un modelo de programación fetal por

restricción del crecimiento en ovinos mayores niveles de los receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y MAS renales hacia fines de la gestación<sup>197</sup>. Mao C y col. también obtuvieron resultados similares: mostraron en un modelo de programación fetal por hipoxia materna en ovejas que los fetos casi a término presentaban un incremento en los niveles proteicos y del ARNm del receptor AT<sub>1</sub>, acompañado de una reducción de los receptores AT<sub>2</sub>. Observaron, al igual que nosotros, una reducción en el área glomerular<sup>240</sup>. Por otra parte, otros estudios muestran que el bloqueo del SRA entre las semanas 2 y 4 de edad, puede prevenir la HTA programada durante la vida fetal por diversas injurias<sup>371-374</sup>. En estudios clínicos se ha observado la activación del SRA en neonatos prematuros asociados a una RCIU. Suzue y col. evidenciaron un aumento de la relación angiotensinógeno/creatinina en orina (marcador de daño renal crónico) al compararlos con neonatos a término. No observaron cambios en el angiotensinógeno plasmático, lo que sugirió una activación del SRA renal<sup>375</sup>. En otros trabajos observaron un aumento en los niveles y actividad de ECA urinaria en prematuros<sup>376</sup>.

Considerando esta disparidad en los antecedentes que figuran en bibliografía, Kett MM reportó en su revisión del año 2011 que esto podría deberse a la gran diversidad de modelos empleados y al amplio rango de edad en las crías estudiadas<sup>196</sup>. Más allá de los resultados contradictorios encontrados en la bibliografía en relación a la asociación entre los niveles de los componentes del SRA intrarrenal en etapas tempranas y la programación de HTA en la vida adulta, los diferentes trabajos y nuestros resultados destacan que un adecuado estado del SRA renal es crucial para el desarrollo normal de este órgano. Podríamos postular que tanto una disminución de la actividad del SRA renal como una activación por sobre los niveles normales esperados para esta edad inducirían una alteración del desarrollo renal. Considerando que en nuestro modelo experimental observamos mayores niveles de AngII y de la expresión de los receptores AT<sub>1</sub>, podríamos hipotetizar que estas alteraciones corresponden a una respuesta compensatoria que intenta contrarrestar el menor crecimiento renal y la tendencia proapoptótica hallada en la corteza renal, posiblemente originados por la deficiencia primaria de zinc. Por otra parte, teniendo en cuenta que la ECA es una metalopeptidasa zinc dependiente, sería esperable que su actividad se encuentre disminuida en los grupos deficientes. Esto podría llevar a un aumento compensatorio de su transcripción y expresión proteica, así como la activación de otras proteasas que también pueden generar AngII, como la catepsina G, la tonina, el activador de plasminógeno tisular, la elastasa2 murina (E2m) y la enzima generadora de AngII sensible a quimostatina (CAGE)<sup>377,378</sup>.



Por otro lado, estudios clínicos demostraron una relación directa entre mujeres embarazadas con bajos niveles de zinc y el nacimiento de sus niños prematuramente y de bajo peso. Los niveles séricos de proteína C reactiva, TNF- $\alpha$  y de IL-8 se encontraron aumentados en el grupo de mujeres embarazadas con bajo zinc. A su vez, el análisis de la placenta reveló un incremento de NF- $\kappa\beta$ , un importante regulador de citoquinas inflamatorias<sup>355</sup>. De acuerdo a esto, otra hipótesis podría ser que los niveles del factor NF- $\kappa\beta$  se encuentren aumentados en las ratas en desarrollo debido a la injuria nutricional y consecuentemente estimule la transcripción de genes del SRA tales como AT<sub>1</sub>. Esto se explicaría a través de la existencia de un sitio de unión para NF- $\kappa\beta$  en el promotor del gen del receptor AT<sub>1</sub><sup>106</sup>. Adicionalmente, se ha demostrado que la AngII induce la activación del sistema NF- $\kappa\beta$ , los mecanismos involucrados aún se encuentran en discusión<sup>92,95,96</sup>. Sin embargo, nuevos estudios serían necesarios para comprobar esta hipótesis en nuestro modelo experimental.

Los resultados de este trabajo también muestran que las ratas machos y hembras presentan diferencias en el SRA renal a los 6 días de vida y que se adaptan de manera diferente a las injurias durante el desarrollo. Se evidenciaron diferencias en el patrón de expresión de los receptores para AngII desde etapas temprana del desarrollo renal, ya que las hembras controles expresan mayores niveles del receptor AT<sub>2</sub> que los machos controles. Por otra parte, las alteraciones renales en etapas tempranas de la vida fueron más marcadas en los machos con dieta deficiente en zinc. Si bien las hembras con restricción de zinc mostraron signos de menor crecimiento corporal y renal, las mismas no presentaron diferencias significativas en las áreas glomerulares y el número de células apoptóticas respecto de sus controles, así como tampoco alteraciones importantes del SRA renal. Si bien los esteroides sexuales tienen una profunda influencia en el desarrollo y la progresión de enfermedades, y podrían contribuir a las diferencias de sexo observadas en la vida adulta<sup>379</sup>, los mismos no explicarían las diferencias sexuales halladas a los 6 días de vida. Dichas alteraciones serían independientes de los esteroides sexuales dado que los animales se encuentran en pleno hiato prepuberal. Sugerimos entonces que las diferencias de sexo halladas a nivel renal podrían deberse a razones inherentes al sexo genético o a modificaciones epigenéticas diferentes.<sup>380</sup>

Diversos estudios de programación fetal han encontrado que las crías machos son más sensibles a los efectos de las injurias *in útero*. Sin embargo, estas diferencias fenotípicas no han sido estudiadas en profundidad. La placenta podría tener un rol importante, dado que diversos modelos de programación fetal demostraron que dichos órganos de las crías hembras se adaptan mejor que la de los machos ante injurias

prenatales <sup>239,240,247</sup>. En este sentido, estudios de programación fetal inducidos por administración de dietas de alto y bajo contenido graso a ratones demostraron que el transcriptoma placentario se modifica en ambos sexos. Sin embargo, las placentas de los fetos hembras son más sensibles a los cambios dietarios, ya que se observó que modifican un mayor número de genes en comparación con los fetos machos frente a las injurias nutricionales. Esto indicaría que en las hembras la placenta presenta una mayor plasticidad y, por ende, una mejor adaptación a los cambios frente a un ambiente intrauterino adverso <sup>240</sup>. Ya que la biología evolutiva define a los mamíferos masculinos como el sexo más energéticamente “costoso” para la madre sería de esperar que la energía invertida en las adaptaciones tisulares ante diversos estresores estuviera volcada preferencialmente en seleccionar a la descendencia femenina, cuya fisiología debe ser preservada para asegurar la reproducción, la lactancia y, en última instancia, la supervivencia de la especie <sup>248,249</sup>. Diversos modelos de programación fetal demostraron que el desarrollo somático de las crías macho no es priorizado respecto al de las hembras, en línea con la idea desarrollada previamente <sup>213,215,237,238,241</sup>.

En otros modelos de programación fetal también se hallaron diferencias de sexo al evaluar el SRA en etapas tempranas. En un modelo de programación de HTA inducida por dieta baja en proteínas en ratas donde se evaluó el SRA en fetos casi a término (19 días de gestación) se observaron mayores niveles de renina y ECA en riñones de los fetos macho que en las hembras. En el mismo modelo, se observó que a los 21 días de vida los receptores AT<sub>1</sub> se encontraban aumentados en el tejido renal de las crías macho, mientras que en las hembras estaba incrementada la expresión proteica de AT<sub>2</sub> y disminuida la renina <sup>369</sup>.

Los resultados del presente estudio demuestran que la deficiencia de zinc durante la vida fetal y la lactancia programa en los animales adultos un incremento de la presión arterial con valores superiores a 140mmHg únicamente en las ratas macho. Estos resultados están de acuerdo con trabajos realizados previamente en el laboratorio <sup>328-330</sup>, y coincidente con estudios clínicos en los que se demostró que individuos con HTA esencial presentaban una deficiencia del micronutriente <sup>381</sup>. A su vez, Chiplonkar y col. demostraron que la ingesta de zinc y su concentración en la membrana eritrocitaria presentaba una correlación negativa con la presión arterial en una población lacto-vegetariana de la India con un alto riesgo de desarrollar deficiencia moderada de este micronutriente <sup>382</sup>. Estudios más recientes encontraron que en pacientes hipertensos los niveles de zinc en pelo y sangre se hallaban disminuidos <sup>319</sup>.

Sin embargo, los mecanismos involucrados en el desarrollo de la HTA por una deficiencia de zinc aún no están claros y se deberían a múltiples factores como el grado de deficiencia, la duración y el periodo de la vida en el cual se produce, ya sea durante la gestación, el periodo postnatal temprano o la adultez. La edad y el sexo también serían importantes ya que la homeostasis del zinc intra y extracelular depende en gran parte de estos factores <sup>381</sup>.

Diferentes modelos de programación fetal observaron hallazgos similares en cuanto a la diferencia de sexo, siendo los machos y no las hembras susceptibles al desarrollo de valores elevados de la presión arterial. En este sentido, la menor perfusión uterina y la dieta alta en sal durante la vida fetal programan un incremento de la presión arterial sólo en ratas machos <sup>215,383</sup>. En ovejas, la exposición fetal a glucocorticoides determina niveles de presión arterial mayores en machos que en hembras <sup>384</sup>. Por lo tanto, las diferencias de sexo en los modelos programación fetal demuestran que las hembras están más protegidas que los machos, independientemente de la especie o de las injurias.

Muchas alteraciones morfológicas y funcionales en órganos importantes para el mantenimiento de parámetros hemodinámicos se ven principalmente modificadas en individuos macho expuestos a una desnutrición específica durante la vida fetal. Es posible que este diferente comportamiento se relacione al menos en parte con los esteroides sexuales que presentan los animales a los 81 días de vida. Se sabe que los estrógenos tienen *per sé* un potente efecto cardioprotector, reduciendo asimismo la tendencia aterogénica. Puede que gracias a esto las hembras resulten menos susceptibles al desarrollo de HTA <sup>389</sup>.

Como se describió anteriormente en esta discusión, hemos demostrado previamente que la deficiencia de zinc durante la gestación, la lactancia y/o el crecimiento postdestete induce un menor número de glomérulos acompañado de menor tasa de filtrado glomerular, mayor proteinuria, fibrosis, hipertrofia de arterias renales, incremento del daño oxidativo y una disminución en el sistema del NO en ratas macho adultas <sup>273,325</sup>. Dichas alteraciones no revirtieron con una dieta con contenido adecuado de zinc luego del destete, motivo por el cual se postuló como mecanismo subyacente la programación fetal por deficiencia del micronutriente <sup>325,326</sup>.

Considerando estos antecedentes a nivel renal y las alteraciones halladas en el presente trabajo a los 6 días de vida, quisimos evaluar el estado del SRA a los 81 días de vida postnatal. El SRA ejerce funciones importantes en la regulación de la presión

y el equilibrio hidroelectrico. Además, el SRA posee funciones paracrinicas, autocrinas e intracrinicas<sup>385</sup>. Por ejemplo, los niveles de AngII son particularmente más elevados en el riñón que en el plasma<sup>165</sup>. Su principal péptido bioactivo, la AngII, está implicado en los procesos hemodinámicos renales a través del receptor AT<sub>1</sub> donde estimula la formación de ERO e interviene en la regulación de la transcripción de genes de crecimiento en células de músculo liso vascular<sup>128,386,387</sup>.

En el presente trabajo de tesis estudiamos el SRA de la corteza renal de ratas adultas a través de sus principales componentes: los péptidos AngII y Ang-(1-7), los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, y las enzimas ECA y ECA2. Los resultados muestran que el brazo presor del SRA renal se encuentra exacerbado en las crías macho con deficiencia de zinc, evidenciado por un aumento en el contenido de AngII y en la relación AngII/Ang-(1-7), así como en la expresión de los receptores AT<sub>1</sub> en la corteza renal. A su vez, no se encontraron diferencias en el contenido de Ang-(1-7) ni de los receptores AT<sub>2</sub> entre los diferentes grupos estudiados. Por otra parte, en las ratas macho los cambios en el SRA renal inducidos por la deficiencia de zinc en etapas tempranas del desarrollo fueron observados también en la vida adulta, sin observar correcciones en estas alteraciones en los machos que recibieron un aporte adecuado de zinc luego del destete. Por lo tanto, estos hallazgos podrían indicar que las alteraciones observadas serían programadas durante la vida fetal y postnatal temprana. En los grupos de ratas hembra no se observaron alteraciones importantes de este sistema, lo que además evidencia que la susceptibilidad en este modelo de injuria en etapas tempranas del desarrollo es sexo dependiente.

El aumento en el contenido de AngII, de la relación AngII/Ang-(1-7) y de AT<sub>1</sub> en la corteza renal no se acompañó de un aumento en la expresión del ARNm de la ECA ni de la ECA2. Esta reportado que la ECA reduce su actividad en el contexto de diferentes tipos de injurias. Sin embargo, diferentes estudios sugieren que esta disminución de la actividad no resulta ser un factor limitante en la conversión de AngI en AngII, ya que la enzima tiene una capacidad muy elevada para catalizar esta reacción. Por ende, es posible que el aumento en la expresión de la vía clásica del SRA no demande un aumento en la expresión de ECA<sup>310,312,388</sup>. Por otra parte, el incremento en los niveles medidos de AngII podrían deberse a las vías no clásicas. La AngII podría estar incrementada por vías enzimáticas de síntesis alternativas a la ECA, ya que la AngII se puede generar directamente a partir de angiotensinógeno mediante la acción de la catepsina G, la tonina y el activador de plasminógeno tisular<sup>390,391</sup>. Además de la ECA, se ha demostrado que la catepsina G, la E2m y la enzima generadora de AngII sensible a quimostatina (CAGE) también tienen capacidad de sintetizar AngII a partir

de AngI<sup>377,378</sup>. Se ha demostrado que la síntesis de AngII a partir de la enzima quimasa posee un papel escaso en condiciones fisiológicas pero que se sobre expresa en pacientes con enfermedad coronaria o renal y en diabéticos<sup>392</sup>. En modelos experimentales, Becari y cols. demostraron que la E2m y ECA participan en conjunto de la conversión de AngI a AngII en condiciones fisiológicas<sup>87</sup>. A su vez, han observado que el tratamiento de SHR y de ratas normotensas con enalapril aumenta la proporción de AngII generada por E2m<sup>91</sup>.

Las alteraciones del SRA intrarrenal podrían contribuir al aumento de la presión arterial y a los cambios observados previamente en este modelo en dicho órgano. Una de las alteraciones renales descritas previamente en los animales Bbm y Bcm es una disminución de la TFG<sup>325</sup>. En este sentido, es conocido que la interacción AngII-AT<sub>1</sub> contrae las arteriolas aferentes y eferentes y estimula la contracción de las células mesangiales, lo que reduce el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular y la carga de sodio filtrada<sup>393,394</sup>. Además, podríamos postular que en este modelo existirían alteraciones en la excreción renal de sodio, el principal electrolito que regula el volumen extracelular y la presión arterial. La Ang II regula la excreción de sodio por sus acciones en sitios vasculares y tubulares renales. La AngII tiene un efecto directo sobre el transporte tubular de sodio, activando al intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana luminal y al cotransportador Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en la membrana basolateral de los túbulos proximales. En la nefrona distal, AngII modula la actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y el canal de sodio epitelial. Además, favorece la reabsorción de sodio y la excreción de potasio en los túbulos colectores mediante la acción de la aldosterona<sup>393,394</sup>. En ratas hipertensas tratadas con AngII a través de la implantación de una bomba osmótica se observó una marcada supresión de la excreción de sodio y del flujo sanguíneo renal<sup>395</sup>. Otras evidencias demuestran que ratas infundidas con AngII mostraron una mayor expresión de los canales ENaC<sup>396</sup> y una activación del cotransportador Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> renal<sup>397</sup>. A su vez, estudios in vitro utilizando fracciones de la membrana basolateral aislada de riñón de cerdo han demostrado que AngII estimula la actividad de Na<sup>+</sup>-ATPasa del túbulo proximal renal a través de la activación de proteína quinasa C<sup>398</sup>. Todos estos mecanismos conducen al aumento en la reabsorción de sodio y agua, y una disminución de la fracción excretada de sodio. Teniendo en cuenta estos datos y nuestros resultados, se requieren nuevos estudios para comprobar si en nuestro modelo experimental existen alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico, así como en los transportadores tubulares de sodio, que puedan estar relacionadas con el aumento de PA que se observa.

Por otra parte la AngII, a través de la activación de los receptores AT<sub>1</sub>, es uno de los principales estímulos para la producción de radicales libres de oxígeno por parte de la enzima NADPH oxidasa<sup>128</sup>. Los radicales libres, en especial el anión superóxido, reaccionan con el NO reduciendo su biodisponibilidad y generando peroxinitritos, especies altamente oxidantes. En trabajos previos hemos observado que los machos Bb y Bc presentaron una menor actividad del sistema del NO renal que fue acompañado de un aumento en el estrés oxidativo, dado por un incremento en la peroxidación lipídica y una reducción en los niveles de los sistemas antioxidantes como en el contenido de la GSH y las actividades de la GPx y la CAT<sup>325</sup>. A su vez, la AngII, junto con el estrés hemodinámico que tiene lugar en la HTA, podría contribuir al aumento de colágeno perivascular y de la relación media/lumen observado en las arterias renales corticales de las ratas macho deficientes en zinc observado en este trabajo. Mediante la estimulación de AT<sub>1</sub> se activan señales intracelulares que modifican la expresión de genes reguladores del crecimiento del músculo liso vascular promoviendo la síntesis de ADN y de proteínas. La AngII también puede estimular el crecimiento de la pared vascular estimulando la producción y la acción de factores mitogénicos como el bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) o el TGF-β (factor de crecimiento transformante beta) que estimulan la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de proteínas<sup>128</sup>. Todos estos factores conducen a un engrosamiento en el espacio subintimal y de la capa media, así como también acumulación de colágeno en la adventicia. Las modificaciones estructurales de la pared arterial tienen importantes repercusiones funcionales ya que contribuyen al mantenimiento de una resistencia vascular renal más elevada. La sobreexpresión de los componentes del eje presor del SRA en ratas macho podría explicar, al menos en parte, las alteraciones renales observadas previamente en este modelo<sup>273,325</sup>.

En cuanto al análisis del SRA en el riñón de los animales adultos, observamos que las crías hembra no presentaron cambios en los niveles de AngII ni de la ECA. Por el contrario, se observó una disminución en la relación AngII/Ang-(1-7) que fue acompañado con aumento del ARNm de la ECA2. Muchos modelos de programación fetal demostraron también alteraciones sexo-dependientes al evaluar el SRA. Por ejemplo, en modelos de programación fetal por insuficiencia placentaria se observó un aumento de la expresión de la ECA2 renal en las ratas adultas hembra normotensas. Asimismo, las crías hembras con restricción durante el desarrollo fetal y ovariectomizadas en la adultez presentaron HTA asociada a una disminución en la expresión de ECA2<sup>235</sup>. Respecto a esto, se ha demostrado que los estrógenos modulan la expresión y actividad de diferentes componentes del SRA<sup>399</sup>. Estudios

experimentales sugieren que el brazo depresor del SRA es más eficiente en ratas hembra que en machos<sup>400</sup>, y que la regulación a través de los esteroides sexuales contribuye a las diferencias de sexo en el SRA y el control de la presión arterial.<sup>401,402</sup> Estudios en rata demostraron que la mayor expresión de la rama presora del SRA en machos es dependiente de testosterona<sup>255</sup>, mientras que los estrógenos aumentan la expresión de la Ang-(1-7) en las hembras<sup>256</sup>. A su vez, otros autores demostraron diferencias de sexo en cuanto a la expresión de genes del SRA renal tales como angiotensinógeno, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub><sup>383</sup>. Es por ello que el aumento marcado del receptor AT<sub>2</sub> en las hembras control podría deberse a diferencias sexo-específicas del transcriptoma renal. El gen que codifica para el receptor AT<sub>2</sub> se localiza en el cromosoma X y podría estar influyendo en la protección de las hembras a la programación de enfermedades asociadas a la HTA a través de un aumento basal en su transcripción en comparación con los machos<sup>403</sup>. Otros trabajos sobre programación fetal muestran también alteraciones en el SRA renal a favor de la vía vasopresora del sistema en los machos pero no en las hembras<sup>404,405</sup>. Dados estos antecedentes y los propios resultados obtenidos en este trabajo, postulamos que las hormonas sexuales influirían diferencialmente en las alteraciones del SRA inducidas por la deficiencia de zinc durante el desarrollo fetal y posnatal que observamos a nivel renal.

El corazón, al igual que el riñón, expresa todos los péptidos precursores, enzimas y receptores del SRA a través de los que actúan sus componentes, configurando en forma completa un SRA tisular con efecto local<sup>152</sup>. Por ejemplo, se ha demostrado la síntesis local de AngII en miocitos y fibroblastos cardíacos<sup>83,84</sup>. Dada la relevancia del SRA en la función cardíaca evaluamos si la restricción de zinc programa durante la vida fetal y postnatal cambios del SRA de este órgano.

Los resultados de esta tesis muestran que, al igual que en el riñón, las crías de ambos sexos expuestas a una deficiencia moderada de zinc en etapas tempranas del desarrollo presentan un retraso del crecimiento cardíaco evidenciado por una disminución del peso del corazón y del ventrículo izquierdo. Las crías macho presentan adicionalmente un menor peso del ventrículo derecho en comparación con sus controles. Por otro lado, el hecho de que la restitución del adecuado aporte de zinc en la dieta luego del destete no normaliza el crecimiento cardíaco demuestra la importancia de este micronutriente para el desarrollo de este órgano durante la vida fetal y la lactancia. Estos resultados no se condicen con el aumento de la vía clásica

del SRA que hemos observado, ya que la acción de la AngII a través de los receptores AT<sub>1</sub> se ha implicado con procesos de hipertrofia y proliferación celular<sup>141,147,148</sup>. Está demostrado que la AngII producida localmente puede promover la inflamación, el estrés oxidativo y el crecimiento y / o la muerte celular, y de esta manera contribuir a la hipertrofia, la fibrosis y la disfunción cardíacas.<sup>406-408</sup> Por ende, hemos inferido que este menor crecimiento cardíaco podría estar mediado por mecanismos independientes del SRA. Los mismos se deberían principalmente a una menor biodisponibilidad de zinc, ya que este elemento participa como cofactor de metaloenzimas y factores transcripcionales implicados en el crecimiento y proliferación celular, y su deficiencia también está implicado en procesos proapoptóticos<sup>409</sup>. Esto se correlaciona con nuestros resultados previos que demostraron que las crías macho presentan cardiomiocitos de menor tamaño y una reducción del espesor parietal del ventrículo izquierdo, que se condicen además con una reducción en la capacidad contráctil cardíaca. Por otro lado, las hembras mostraron ser menos sensibles a los efectos de esta deficiencia nutricional ya que no presentan alteraciones funcionales mecánicas o morfológicas en el ventrículo izquierdo. Si se observó en ratas deficientes de ambos sexos una disminución en la actividad del sistema del NO y aumento de la apoptosis. Estas alteraciones fueron más acentuadas en las crías macho que en las hembras<sup>329,330</sup>.

Los resultados de esta tesis muestran que las crías Bbm presentaron un incremento del brazo presor del SRA dado por mayores niveles de AngII, una relación AngII/Ang-(1-7) aumentada e incremento del receptor AT<sub>1</sub> a los 81 días de vida. La combinación de esta activación del SRA presor junto con la reducción en la biodisponibilidad del zinc podría explicar la mayor producción de anión superóxido inducida por la NADPH oxidasa que hemos observado en estos animales. Por un lado, se ha demostrado que la AngII está directamente implicada en la formación de ERO y en la expresión de la NADPH oxidasa en células endoteliales y del músculo liso vascular. La participación de las ERO cumplen un papel central en el desarrollo de disfunción endotelial, la inflamación, la hipertrofia, la apoptosis, la migración, la fibrosis y la angiogénesis que desencadenan y acompañan aquellas patologías en las cuales la AngII es un componente central<sup>410-413</sup>. Por otro lado, se ha descrito que el zinc tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiapoptóticas y es relevante en la regulación del sistema del NO cardíaco<sup>320,414</sup>. En este sentido, se ha demostrado que el mismo limita el daño inducido por las ERO, suprimiendo así algunas de las vías de señalización que conducen a los procesos apoptóticos e inflamatorios<sup>320,415</sup>. En trabajos anteriores hemos demostrado que las ratas Bbm presentan en el ventrículo izquierdo una menor producción de NO y un aumento en la actividad de enzimas



antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx) que contribuirían a disminuir las concentraciones aumentadas del anión superóxido que también observamos en este tejido <sup>330</sup>.

En el presente trabajo también evaluamos la morfología de las arterias coronarias y los niveles de citoquinas proinflamatorias en el corazón de las crías macho. Observamos en el grupo Bbm un incremento del colágeno perivascular acompañado de remodelado hipertrófico de la pared muscular, y un incremento de IL-6 y del TNF- $\alpha$  en estas arterias. Inferimos que la activación del SRA local debido a la deficiencia de zinc, estaría influyendo para producir estas alteraciones. La bibliografía reporta que la AngII interactuando con los receptores AT<sub>1</sub> favorece el crecimiento del músculo liso vascular así como también el aumento del depósito de colágeno. Se ha demostrado que AngII a través del receptor AT<sub>1</sub> induce la producción de colágeno tipo I en células de músculo liso vascular a través de la activación del gen del procolágeno tipo I y tipo III por la vía de la MAPK/ERK <sup>109,110</sup>. AngII también inhibe la expresión de algunas colagenasas <sup>141</sup>. Otro factor inducido por AngII es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), inducido por las vías del ERK y JNK <sup>112</sup>. En cuanto al aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$ , numerosos trabajos han demostrado el efecto de la AngII como activador de NF- $\kappa$ B a nivel citoplasmático en muchos tejidos, tanto a través de las vías clásicas como de las no-canónicas del NF- $\kappa$ B <sup>92</sup>. El NF- $\kappa$ B tiene la propiedad de activar la expresión de cito y quimioquinas y muchos otros mediadores proinflamatorios, por lo que se lo considera uno de los 'reguladores maestros' de la inflamación <sup>97</sup>. Entre ellos, el NF- $\kappa$ B es capaz de inducir la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-6 <sup>99</sup>, y se ha demostrado que la AngII es capaz de inducir la síntesis de TNF- $\alpha$  en fibroblastos cardíacos <sup>102</sup>. El zinc por su parte posee funciones antifibróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas <sup>320</sup> por lo que su deficiencia podría favorecer adicionalmente la expresión de un perfil inflamatorio a nivel tisular.

En las crías Bcm, las alteraciones del SRA cardíaco fueron menos marcadas ya que no presentaron cambios en el contenido de AngII, en la relación AngII/Ang-(1-7), ni en la expresión de ARNm de ECA y ECA2. Sin embargo, se verían programadas durante la vida fetal y postnatal temprana alteraciones a nivel del receptor AT<sub>1</sub>, ya que su expresión transcripcional y proteica se encontraron aumentados en este grupo. Los cambios en este sistema se evidenciaron por un menor daño del ventrículo izquierdo, dado que no se observaron cambios en la producción de anión superóxido inducido por NADPH-oxidasa ni en el remodelado de las arterias coronarias. En trabajos previos observamos que este grupo de animales presenta también un incremento en la actividad de la GPx y de la SOD en el ventrículo izquierdo <sup>330</sup>. La mayor actividad de estas

defensas antioxidantes podría, a diferencia de lo observado en el grupo Bbm, compensar la mayor producción de ERO inducida por la NADPH oxidasa.

Sin embargo, el adecuado aporte de zinc luego del destete no logró prevenir otras alteraciones observadas en el ventrículo izquierdo de los animales Bbm, como el incremento de la expresión de citoquinas proinflamatorias y del colágeno perivascular de las arterias coronarias. Estas alteraciones podrían estar mediadas en parte por el aumento en los niveles del receptor  $AT_1$ , así como ser consecuencia de la deficiencia temprana de este micronutriente en este tejido.

En contra posición, las crías hembras Bbh solamente presentaron un incremento en la relación  $AngII/Ang-(1-7)$ , sin evidenciar otras alteraciones en el sistema. Tampoco desarrollaron HTA. Sin embargo, esto no significa que sean insensibles a la programación por restricción de zinc en etapas tempranas del desarrollo, ya que en trabajos previos demostramos que este grupo presentó una disminución en la actividad del sistema del NO y un aumento de la apoptosis, aunque las diferencias eran menos marcadas que en el grupo Bbm<sup>330</sup>. En cuanto a estos resultados, postulamos que las en los adultos las hormonas sexuales influirían en forma diferencial en el desarrollo de las alteraciones cardíacas inducidas por esta injuria nutricional. Se ha demostrado que los estrógenos poseen un papel protector contra el desarrollo de HTA en las crías hembra con RCIU. En otros modelos de programación fetal se observaron alteraciones en el SRA y diferencias de sexo, sugiriendo que la HTA programada por una injuria nutricional se debería al aumento de la vía vasoconstrictora en los machos por mecanismos dependientes de testosterona mientras que las hembras tendrían una protección aparentemente por aumento de la vía vasodilatadora del SRA<sup>235,236,250,380</sup>.

En estudios previos demostramos que la restricción de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento postdestete programa disfunción endotelial en la arteria aorta torácica, dado que se evidenció una menor respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio asociada a una menor producción de NO y una reducción en la expresión de la eNOS en las crías Bb y Bc machos y hembras<sup>328</sup>.

En diferentes modelos de programación fetal, la menor actividad del sistema del NO vascular se acompaña no sólo de alteraciones en la capacidad vasodilatadora sino también en la vasoconstrictora. Injurias durante el desarrollo intrauterino como la exposición a LPS o la restricción calórica, y la separación materna durante la lactancia,

programan una menor respuesta frente a la ACh acompañada de una mayor respuesta vasoconstrictora frente a la fenilefrina, la noradrenalina o la angiotensina II en diferentes lechos vasculares de ratas adultas <sup>231,345,416</sup>.

En los modelos experimentales mencionados, la menor producción endotelial basal de NO tiene como consecuencia una exacerbación en la respuesta a los diferentes agentes vasoconstrictores. En el presente trabajo de tesis, evaluamos si la menor capacidad vasodilatadora inducida por la deficiencia de zinc se acompañaba de alteraciones en la respuesta vasoconstrictora a la AngII en aortas de las ratas adultas. Es sabido que la AngII desempeña un papel crucial en la regulación del tono vascular en el estado fisiológico, así como en la patogénesis de la HTA y otras disfunciones cardiovasculares. <sup>37,157</sup>. Numerosos investigadores demostraron que una de las alteraciones fundamentales que condiciona el riesgo de desarrollar HTA en la descendencia adulta en modelos de injuria prenatal por nicotina e hipoxia es una sensibilidad aumentada a los efectos contráctiles de la AngII <sup>245,417</sup>. Por otra parte, la mayoría de las funciones fisiológicas y patológicas de AngII para controlar la contractilidad vascular está mediada en gran parte por su interacción con el receptor AT<sub>1</sub> <sup>23,32,182</sup>. Contrariamente a lo esperado, los resultados de esta tesis doctoral muestran que la respuesta vasoconstrictora frente a la AngII fue menor en las ratas con deficiencia de zinc en ambos sexos. Esta alteración en la respuesta vasoconstrictora fue programada en etapas tempranas del desarrollo ya que los animales que recibieron aportes adecuados de zinc luego del destete no demostraron una mejoría en la respuesta vasoconstrictora al compararlos con los grupos Bb. Resultados similares fueron observados en la respuesta frente a otros agentes vasoconstrictores como la fenilefrina, un agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. La menor capacidad vasoconstrictora en estos grupos podría estar asociada a diferentes factores: cambios en la afinidad de los receptores a la AngII, alteraciones en la expresión de proteínas contráctiles, o alteraciones en la disponibilidad de calcio.

En cuanto a esto, en estudios en paralelo de reactividad vascular demostramos que en aortas sin endotelio de las crías Bb y Bc de ambos sexos se observó una menor respuesta máxima vasoconstrictora frente a la cafeína <sup>328</sup>. La cafeína interactúa con receptores de rianodina presentes en el retículo sarcoplásmico de las células de músculo liso vascular, induciendo la liberación de calcio hacia el citoplasma lo que genera su contracción <sup>418</sup>. Nuestros resultados muestran que la deficiencia de zinc durante etapas tempranas del desarrollo programaría alteraciones en la movilización de calcio en ratas de ambos sexos que podrían explicar la respuesta vasoconstrictora atenuada frente a AngII y a otros agentes vasoconstrictores como la fenilefrina. Dado

que no se observaron diferencias en la constricción aórtica con KCl (respuesta contráctil máxima e independiente de calcio intracelular), podríamos sugerir que la respuesta alterada a la AngII se debería a las alteraciones en la movilización de los depósitos de calcio intracelular, y no en la entrada de calcio extracelular. En cuanto a posibles alteraciones en las proteínas contráctiles, el zinc es importante para la transcripción génica de la actina en el músculo liso <sup>419</sup> por lo que también podría estar contribuyendo a esta respuesta vasoconstrictora alterada.

En este trabajo de tesis también hemos observado alteraciones en el remodelado de la aorta en los machos deficientes en zinc dado por un incremento de la relación pared media/lumen que se acompañó de un aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ). En el grupo Bcm las citoquinas proinflamatorias también se encontraron incrementadas. Este hecho podría estar relacionado con el aumento de la expresión de los receptores AT<sub>1</sub> observado en estos grupos. Esta ampliamente descrito que AngII interactuando con los receptores AT<sub>1</sub> estimula los procesos inflamatorios e hipertróficos principalmente a través de la activación de NF $\kappa$ B <sup>92,152,420,421</sup>.

Como se ha descrito en trabajos clínicos y experimentales, la HTA y otras enfermedades cardiovasculares y renales pueden ser causadas por la activación del SRA sistémico y tisular. La mayor actividad de este sistema se debería a la interacción entre cambios genéticos (mutaciones y alteraciones epigenéticas de los genes relacionados con el SRA) con diferentes factores de riesgo ambientales, hormonales y nutricionales <sup>11,15</sup>. Por otra parte, como se discutió previamente, la influencia de los esteroides sexuales sobre los diferentes componentes de este sistema contribuiría a explicar las diferencias de sexo observadas en la incidencia y desarrollo de HTA, así como el consecuente daño de los órganos blanco <sup>250</sup>.

El presente trabajo de tesis demuestra que las alteraciones renales y cardiovasculares asociadas con el aumento del brazo presor del SRA fueron evidenciadas principalmente en las crías machos adultas expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento posdestete. Dados estos resultados nos preguntamos si la activación del SRA tisular inducida por esta deficiencia nutricional durante el crecimiento modificaría la respuesta de los tejidos cardiovascular y renal a una segunda injuria durante la vida adulta, como lo es la activación del SRA sistémico. Es por ello que en el segundo protocolo de este trabajo

de tesis se evaluó la respuesta de la infusión crónica de AngII sobre la PA y el sistema cardiovascular y renal en las ratas macho adultas.

La infusión subcutánea crónica de AngII en ratas es un modelo experimental utilizado para el estudio de HTA <sup>422-425</sup>. Coincidente con lo publicado en otros modelos experimentales, la administración sistémica de este péptido indujo un incremento progresivo de la PAS en todos los grupos estudiados. Los animales Bbm y Bcm infundidos con AngII mostraron mayores valores de PAS que el grupo Ccm. Es posible entonces que, en el modelo experimental estudiado, el aumento de los niveles sistémicos de AngII potencie la activación de los SRA tisulares que fueron previamente inducidos por la deficiencia de zinc. Para comprobar esta hipótesis, evaluamos los efectos de la infusión de la AngII durante 14 días sobre la morfología de la aorta y arterias coronarias y renales, así como el efecto en los niveles de citoquinas inflamatorias en la aorta, el riñón y el tejido cardíaco de las ratas macho adultas expuestas a la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y el crecimiento.

Las arterias se remodelan con el objetivo de mantener constante la tensión de la pared del vaso. En la HTA, el aumento sostenido de la presión induce mecanismos de adaptación en los vasos aumentando el espesor de la pared y/o reduciendo el radio de la luz para mantener constante la tensión parietal <sup>426</sup>. En pacientes hipertensos y en modelos animales de HTA se observa, en vasos de resistencia, un remodelado hipertrófico o eutrófico hacia la luz que contribuye a aumentar la resistencia periférica y la presión arterial, afectando también el flujo sanguíneo en diferentes tejidos <sup>427</sup>. El análisis de la morfología de las arterias renales, coronarias y de la aorta fue realizado a los 81 días de vida luego de la infusión con AngII. En los animales control, además de inducirse la HTA como se esperaba, se produjo un remodelado de los vasos sanguíneos estudiados atribuible a los efectos proliferativos, fibróticos e inflamatorios de la AngII en estos tejidos diana <sup>92,100,109,113,114</sup>. Se ha demostrado que la infusión crónica de AngII incrementa los niveles de AT<sub>1</sub> en la vasculatura y que a través de estos ejerce sus principales acciones sobre los procesos de remodelado vascular y el estado inflamatorio de los mismos <sup>411,423</sup>. En la aorta y en las arterias renales se observó hipertrofia de la pared vascular, y en las arterias coronarias se observó un incremento en los depósitos de colágeno perivascular. Estas alteraciones que observamos se acompañaron de un importante incremento en las citoquinas proinflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Por otro lado, los efectos de la administración crónica de AngII sobre el remodelado vascular y los procesos inflamatorios fueron más leves en los animales expuestos a una restricción dietaria de zinc durante algún periodo de sus vidas. Esto se evidenció al observarse que solamente las aortas de las ratas Bbm y Bcm infundidas con AngII presentaban un aumento del espesor media/lumen tras la infusión de AngII, respecto de Bbm y Bcm que recibieron SF. Sin embargo, al evaluar las arterias renales y coronarias, las ratas Bbm y Bcm infundidos con AngII no evidenciaron diferencias significativas en el remodelado hipertrófico respecto de sus controles infundidos con SF. En cuanto a los parámetros inflamatorios evaluados, la infusión con AngII incrementó los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en estos animales. Sin embargo, esta respuesta fue de menor magnitud en los animales que recibieron una dieta deficiente en zinc en comparación con los controles que recibieron aportes adecuados de zinc en toda su vida, en los que se evidenció un aumento dramático de estas citoquinas tras la infusión con AngII.

Los resultados de este protocolo indican que la infusión con AngII exacerbaría algunos de los efectos inducidos previamente por la injuria nutricional, como el incremento de la PA, el estado inflamatorio, y el remodelado hipertrófico de la aorta. Sorprendentemente no evidenciamos cambios significativos en las alteraciones morfológicas de las arterias a nivel cardíaco y renal. Teniendo en cuenta los resultados del protocolo I, suponemos que esto podría relacionarse con el aumento del brazo presor del SRA observado previamente en estos tejidos. Si bien existiría una mayor abundancia de los receptores AT<sub>1</sub> en estos tejidos, el aumento de AngII tisular estaría generando una respuesta inflamatoria y un remodelado vascular alterado que precede a la infusión con AngII, no pudiendo observarse mayores efectos mediante la infusión. Esto podría estar relacionado con cambios de diferentes componentes del SRA tisular luego de la infusión de AngII, como un aumento compensador del brazo depresor o una menor respuesta de los receptores AT<sub>1</sub> a este péptido debido a una desensibilización de los mismos. Los receptores AT<sub>1</sub> funcionan como un punto de control para regular los efectos de la AngII sobre los órganos blanco. Los niveles elevados de AngII durante un tiempo prolongado inducen una disminución de la intensidad de la respuesta mediada por AT<sub>1</sub>, fenómeno de desensibilización homóloga o taquifilaxia. Los mecanismos que explican este fenómeno son ampliamente discutidos: en general se cree que después de la unión de la AngII a los receptores AT<sub>1</sub>, el complejo AngII-AT<sub>1</sub> es rápidamente fosforilado en el extremo terminal citoplasmático del receptor a través de la vía de la PKC y del receptor asociado a proteína G kinasa. AngII-AT<sub>1</sub>-fosforilado recluta proteínas reguladoras (arrestinas)

que son las responsables de la internalización del receptor y su posterior desensibilización<sup>428-432</sup>.

En resumen, la restricción moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y la vida posnatal temprana programó un menor desarrollo somático que perduró hasta la vida adulta. A su vez, esta injuria nutricional alteró el normal desarrollo del riñón, dado por la menor superficie de filtrado glomerular y el mayor número de células apoptóticas observado en el tejido renal de las crías macho de 6 días de vida. Estos cambios se vieron acompañados por niveles renales aumentados de AngII, ECA, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en las crías macho durante la vida temprana. Por lo que podemos inferir que la programación fetal de alteraciones renales por deficiencia moderada de zinc sería sexo dependiente.

El eje presor del SRA expresado en los órganos con importante incidencia sobre el sistema cardiovascular, tales como el riñón y corazón, se encontró exacerbado en la vida adulta de los animales macho con esta injuria nutricional. Esto se acompañó de un remodelado de las arterias de resistencia e HTA, probablemente por un desbalance del SRA, que conducen a las alteraciones observadas previamente en este modelo: aumento en el estrés oxidativo, disminución en el sistema del NO, remodelado de tejido cardiovascular y renal, y una menor TFG. Las ratas hembras serían menos sensibles a esta injuria nutricional, ya que no presentaron incremento de PA ni alteraciones significativas en el SRA cardiaco, renal y vascular.

La administración de una dieta con contenido adecuado en zinc durante el crecimiento posdestete en las ratas macho no logró prevenir la mayoría de los cambios observados. Este hecho podría estar relacionado con las alteraciones observadas en el SRA tanto en etapas tempranas de la vida como en la adultez. Esto indica que existen alteraciones en las ratas adultas que son programadas por la restricción de este micronutriente en etapas críticas del desarrollo. En consecuencia, la deficiencia moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y la vida temprana predispone a la aparición de enfermedades cardiovasculares y renales en la vida adulta.

## **7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**



Los resultados de la presente tesis doctoral muestran, por primera vez, la influencia de la deficiencia moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y posnatal sobre el sistema renina angiotensina en diferentes tejidos involucrados en la regulación de la PA, como lo son el riñón, el corazón y los vasos sanguíneos. Otro aspecto interesante de este trabajo es el estudio de las diferencias de sexo en los efectos de esta injuria nutricional.

La restricción moderada de zinc durante la organogénesis provocó una RCIU evidenciado por un menor desarrollo corporal y de los tejidos renal y cardíaco de las ratas de ambos sexos, que persistió incluso hasta la vida adulta de los animales a los que se les restituyó el contenido adecuado de zinc en la dieta luego del destete. A su vez, las ratas macho presentaron HTA en la vida adulta. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de programación fetal, la cual postula que una RCIU asociada a un menor peso al nacer, puede conducir al desarrollo de ECV en la vida adulta <sup>433</sup>.

En este trabajo de tesis demostramos que esta injuria nutricional durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano indujo una reducción del área de filtración glomerular y la activación de procesos apoptóticos en el tejido renal de las crías macho. Dichas alteraciones se acompañaron de un desbalance en la expresión de ciertos componentes del SRA, dado el aumento del contenido de AngII, de la relación AngII/Ang-(1-7) y de la expresión de sus receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en el tejido renal en desarrollo.

Existen evidencias clínicas y experimentales que respaldan la activación temprana de SRA en el nacimiento y en la adultez de individuos y modelos animales con RCIU <sup>195,375,376,434</sup>. Sin embargo, los mecanismos que participan de esta activación aún no están aclarados. Se ha postulado que la inmadurez renal, pulmonar y suprarrenal vinculada al estrés ambiental y hemodinámico de la transición temprana ex-útero podría contribuir fuertemente a desencadenar alteraciones del SRA <sup>195</sup>. Como se ha descrito previamente, el zinc es un micronutriente ubicuo y con múltiples funciones antioxidantes, antiinflamatorias, antiapoptóticas y proliferativas <sup>49,303</sup>. Por lo tanto, la deficiencia de zinc generada en nuestro modelo experimental podría inducir alteraciones en el crecimiento y desarrollo intrauterino de los tejidos cardiovascular y renal que podrían estar relacionadas con la activación del SRA en etapas tempranas de la vida.

Este trabajo de tesis evidenció también una respuesta a la deficiencia de zinc dependiente del sexo en los parámetros evaluados del SRA y la morfología renal en

edades tempranas. Las hembras expuestas a la restricción de este micronutriente no presentaron alteraciones morfológicas evidentes ni cambios en el estado del SRA de este órgano. No están claros los mecanismos por los cuales se desarrolla una susceptibilidad diferencial ante la exposición a diferentes agresores durante el desarrollo intrauterino y la vida posnatal temprana. Las diferencias encontradas entre las crías macho y hembras sometidas a esta injuria nutricional podrían deberse a diferentes factores, como por ejemplo diferencias en los patrones genéticos y transcripcionales y/o a modificaciones epigenéticas dependientes del sexo, así como también a la influencia de las hormonas maternas que impactan de forma diferencial en la descendencia macho o hembra <sup>234</sup>. En este sentido, sería interesante realizar estudios a futuro en las madres gestantes, así como también en el cordón umbilical para evaluar, por ejemplo, factores de transcripción que se encuentren involucrados en la regulación génica de los componentes del SRA.

Trabajos previos realizados en otros modelos de programación fetal de enfermedades cardiovasculares demuestran que las alteraciones del SRA contribuyen activamente, desde el inicio del desarrollo, a las consecuencias cardiovasculares y renales observadas a largo plazo <sup>195,197,434,435</sup>. En nuestro modelo experimental, las crías macho que recibieron una dieta baja en zinc durante toda su vida presentaron cambios del eje AngII-AT<sub>1</sub> en los tejidos renal y cardíaco, así como en la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la arteria aorta. Sin embargo, también se observaron alteraciones en la expresión de este sistema en aquellas ratas en las que se restableció el contenido de zinc en la dieta luego del deteste. En el tejido renal y aórtico de estos animales se encontraron cambios semejantes a los hallados en los animales Bbm. Mientras que, en el tejido cardíaco, los animales Bcm solo mostraron un aumento de los receptores AT<sub>1</sub>.

Se ha descripto que modificaciones epigenéticas, tales como metilaciones de ADN, modificaciones de histonas y microARN, podrían estar involucradas en algunas de las alteraciones del SRA, así como en las modificaciones estructurales y funcionales de los vasos, el corazón y los riñones. A su vez, otros investigadores han demostrado que estas modificaciones epigenéticas aumentan la predisposición a las enfermedades cardiovasculares y renales en diversos modelos de programación fetal al modificar patrones de expresión de genes claves para el desarrollo de estas patologías <sup>436</sup>. Es por ello que nos proponemos evaluar en futuros estudios si en este modelo existen cambios epigenéticos que podrían explicar las alteraciones observadas en el SRA tisular.

El incremento de la vía AngII/AT<sub>1</sub>, junto al déficit de zinc, podría contribuir al aumento de la PA y las alteraciones morfológicas y funcionales observadas en las crías

macho de 81 días de vida, como lo son el remodelado de las arterias renales y cardíacas, el aumento de las citoquinas proinflamatorias en los tejidos cardíaco, aórtico y renal y el incremento de estrés oxidativo cardíaco. El desequilibrio del SRA renal podría estar influenciando también en el incremento del estrés oxidativo, la disminución del sistema del NO y la menor TFG que observamos en trabajos previos<sup>325</sup>.

Por otra parte, los resultados sugieren que la activación del SRA en los sistemas cardiovascular y renal inducida por esta deficiencia nutricional durante el crecimiento de las crías macho modificaría la respuesta de estos tejidos a una segunda injuria durante la vida adulta, como lo es la activación del SRA sistémico. La infusión crónica de AngII durante la vida adulta agravaría los efectos causados por la deficiencia dietaria de zinc, ya que estos animales presentaron mayores niveles de PA y de citoquinas inflamatorias en los tejidos cardiovascular, así como un mayor remodelado aórtico respecto a los animales infundidos con solución fisiológica. Esto podría conducir a un mayor riesgo de padecer ECV en estos animales.

En trabajos recientes demostramos que la deficiencia de zinc durante diferentes periodos del crecimiento presenta una menor capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio asociada a una menor actividad del sistema del NO<sup>328</sup>. El presente trabajo demuestra que la capacidad vasoconstrictora se encontraría también alterada, ya que se observó una menor respuesta contráctil en anillos de aorta expuestos a la AngII en los grupos Bb y Bc de ambos sexos. Teniendo en cuenta resultados previos, sugerimos que esta disfunción vascular podría deberse a modificaciones en la movilización del calcio citoplasmático, dado que se observó este mismo patrón de contractilidad deficiente luego de inducir la liberación de calcio por parte del retículo sarcoplásmico, en anillos de aorta estimulados con cafeína,<sup>328</sup>. Estos resultados abren nuevas perspectivas de estudio, principalmente en la profundización de los mecanismos involucrados en estas alteraciones, como el impacto de la deficiencia de zinc sobre la expresión génica de proteínas contráctiles.

Por otro lado, resultan interesantes los hallazgos de este estudio en las ratas hembras adultas expuestas a la restricción dietaria de zinc. Hemos demostrado que las hembras serían menos sensibles a esta injuria nutricional, ya que solo presentaron algunas alteraciones en los parámetros evaluados del SRA. Mientras que ambos grupos Bbh y Bch, presentaron menor desarrollo cardíaco, solo el grupo Bbh presentó un

incremento de la relación AngII/Ang-(1-7). Además, los valores de PA fueron similares a las crías controles.

Las mujeres en edad reproductiva tienen menor incidencia de HTA que los hombres de la misma edad, sin embargo, el riesgo de desarrollar esta enfermedad aumenta después de la menopausia, cuando disminuyen los niveles de estrógenos <sup>437</sup>. Diversos estudios han establecido la importancia de los esteroides sexuales en la modulación del SRA. En ratas macho se ha evidenciado la expresión preferencial de la vía clásica del SRA dependiente de testosterona <sup>255</sup>. En hembras en cambio se ha observado que los estrógenos favorecen la expresión de la vía no-clásica <sup>256</sup>. Esto sugiere que, en las hembras, los esteroides sexuales participan de la modulación del equilibrio entre las dos vías, favoreciendo la vía no-clásica en las hembras.

Por lo tanto, los resultados de esta tesis brindan nuevos conocimientos sobre la relación entre la deficiencia de zinc durante el desarrollo prenatal y postnatal, el SRA tisular y el desarrollo de patologías cardiovasculares en la vida adulta. La contribución de este trabajo de tesis a la comunidad científica es relevante ya que destaca la importancia de optimizar el aporte de micronutrientes en la dieta durante el embarazo, la lactancia y el crecimiento, para prevenir la aparición de alteraciones renales y cardiovasculares que pueden desencadenar en ECV en la vida adulta.

## **8. RESUMEN**

## **Programación fetal de enfermedades cardiovasculares y renales:**

### **Participación del Sistema Renina Angiotensina en un modelo de deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y postnatal**

En trabajos previos hemos demostrado que la deficiencia moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y la vida posnatal temprana constituye un modelo de programación fetal de HTA y enfermedad cardiovascular y renal en ratas macho. El zinc es un micronutriente esencial de gran importancia biológica dadas sus propiedades antioxidantes, anti-apoptóticas, antiinflamatorias y estabilizantes de membranas. Se postula al SRA como uno de los candidatos involucrados en el desarrollo de la HTA y las enfermedades asociadas a la programación fetal.

El objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar la participación del SRA renal y cardiovascular en la fisiopatología de la programación fetal por deficiencia moderada de zinc, tanto en etapas tempranas del desarrollo como en la vida adulta de ratas machos y hembras. Nos propusimos también evaluar, en ratas macho adultas previamente expuestas a una deficiencia de zinc en diferentes momentos de la vida, el impacto de una infusión crónica de AngII sobre la PA y órganos relacionados como el corazón, el riñón y la aorta.

Este estudio fue llevado a cabo en ratas Wistar preñadas. Recibieron dieta control (30 ppm de zinc) o baja en zinc (8 ppm de zinc) durante la preñez hasta el destete de las crías. Las crías fueron sacrificadas al día 6 de vida o continuaron con sus madres hasta el destete. Luego del destete, las crías de madres controles recibieron dieta control. Mientras que las crías de madres que recibieron dieta baja en zinc fueron alimentadas con dieta control o baja en zinc. A los días 36, 51, 66 y 81 de vida, se midió la PAS. Por otro lado, un grupo de crías macho de cada grupo experimental recibieron desde el día 68 de vida una infusión crónica de AngII o de SF y cada 3 días se registró la PAS. Todas las crías fueron sacrificadas a los 81 días de vida.

Las ratas deficientes en zinc de ambos sexos presentaron menor peso corporal y renal a los 6 días. Sólo en las crías macho se acompañó de menor área de filtrado glomerular, mayor número de células apoptóticas y un desequilibrio en los componentes del SRA renal dado por un incremento de AngII, ECA, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>.

En las ratas sometidas a restricción de zinc durante la gestación y la lactancia se observó, a los 81 días de vida, que los machos presentaron un incremento de la PAS mientras que en las ratas hembra los valores fueron normales. Las ratas de ambos sexos presentaron un menor peso corporal, así como también menor peso cardíaco y renal. La dieta con contenido adecuado de zinc posdestete no logró normalizar estos parámetros.

Se encontraron alteraciones en el SRA tisular a los 81 días de vida. Evidenciamos un incremento en la rama presora del SRA, siendo más afectados los animales del grupo con restricción de zinc durante toda la vida. Estos presentaron aumento de la relación AngII/Ang-(1-7) y del contenido de AT<sub>1</sub> en tejido renal y cardíaco. En el tejido cardíaco presentaron además incremento en la producción de anión superóxido inducido por NADPH-oxidasa. La dieta con contenido adecuado de zinc posdestete no logró prevenir estas alteraciones, ya que las crías con restricción de zinc solo durante la gestación y lactancia presentaron los mismos hallazgos en el tejido renal mientras que solo se observó un incremento de AT<sub>1</sub> en el tejido cardíaco.

En la aorta, las crías macho expuestas a deficiencia de zinc presentaron aumento de los receptores AT<sub>1</sub>. Sin embargo, se evidenció una menor respuesta vasoconstrictora a la AngII en anillos de aorta en las crías con restricción de zinc de ambos sexos.

Las hembras fueron menos sensibles a esta injuria nutricional que a su vez presentaron un incremento en la rama vasodilatadora del tejido renal, dado por una menor relación AngII/Ang-(1-7) y el aumento de ECA2. Sólo las crías hembra con restricción de zinc durante toda la vida mostraron un aumento de la relación AngII/Ang-(1-7) en tejido cardíaco.

Las crías macho expuestas a una infusión crónica de AngII durante la vida adulta presentaron un aumento de la PAS en todos los grupos, alcanzando las ratas expuestas a la restricción de zinc valores más elevados. A su vez se observó un incremento de los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en todos los tejidos evaluados, cambio que fue menos marcado en las ratas deficientes en zinc. La infusión con AngII incrementó el espesor media lumen de la aorta en todos los grupos, pero solo indujo cambios en el remodelado de las arterias renales y cardíacas en las crías que recibieron dieta control. Esto podría deberse a que la dieta deficiente en zinc per sé indujo un remodelado en estas arterias de resistencia y un aumento de las citoquinas inflamatorias,

probablemente mediante la activación del SRA que hemos observado en estos animales.

En este trabajo de tesis doctoral demostramos que una injuria nutricional por deficiencia moderada de zinc durante el desarrollo intrauterino y posnatal altera el equilibrio del SRA cardíaco y renal, principalmente en ratas macho. Las alteraciones del SRA se producen durante el desarrollo temprano y que no pueden ser prevenidas con el adecuado contenido de zinc en la dieta luego del destete. Este trabajo fortalece la importancia de optimizar la dieta durante el desarrollo intrauterino y posnatal temprano para evitar programar factores de riesgo cardiovasculares en la vida adulta.



## **9. ABREVIATURAS**

<b>AC</b>	Área de colágeno perivascular
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AII</b>	Angiotensina II
<b>AL</b>	Área de la luz
<b>AL</b>	Área de la luz vascular
<b>AM</b>	Área de la túnica media vascular
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>Ang</b>	Angiotensina
<b>ANMAT</b>	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AT<sub>1</sub></b>	Receptor de angiotensina II tipo 1
<b>AT<sub>1A</sub></b>	ARNm del receptor AT <sub>1</sub> tipo A
<b>AT<sub>1B</sub></b>	ARNm del receptor AT <sub>1</sub> tipo B
<b>AT<sub>2</sub></b>	Receptor de angiotensina II tipo 2
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>ATV</b>	Área total de sección transversal vascular
<b>ATVC</b>	Colágeno perivascular de la adventicia
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl-2
<b>Bbh</b>	Crías hembras que recibieron dieta baja en zinc durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento posdestete
<b>Bbm</b>	Crías macho que recibieron dieta baja en zinc durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento posdestete
<b>Bch</b>	Crías hembras que recibieron dieta baja en zinc durante la vida fetal y la lactancia, y dieta control durante el crecimiento post-destete
<b>Bcl2</b>	Proteína 2 del linforma de células B, de B-cell lymphoma 2
<b>Bcm</b>	Crías macho que recibieron dieta baja en zinc durante la vida fetal y la lactancia, y dieta control durante el crecimiento post-destete
<b>Bh</b>	Crías hembras de 6 días de vida que recibieron dieta baja en zinc durante la etapa fetal y la lactancia
<b>Bm</b>	Crías macho de 6 días de vida que recibieron dieta baja en zinc durante la etapa fetal y la lactancia
<b>BPN</b>	Bajo peso al nacer
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CAGE</b>	Enzima generadora de angiotensina II sensible a quimostatina, de Chymostatin sensitive angiotensin II generating enzyme
<b>Cch</b>	Crías hembras que recibieron dieta control durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento post-destete

<b>Ccm</b>	Crías macho que recibieron dieta control durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento post-destete
<b>Ch</b>	Crías hembras de 6 días de vida que recibieron dieta control durante la etapa fetal y la lactancia
<b>CICUAL</b>	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
<b>Cm</b>	Crías macho de 6 días de vida que recibieron dieta control durante la etapa fetal y la lactancia
<b>CN</b>	Control negativo
<b>CpG</b>	Citosina-guanina
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento del tejido conectivo, de Connective tissue growth factor
<b>DCT1</b>	Transportador de cationes divalentes tipo 1, de Divalent cation transporter 1
<b>DEPC</b>	diethylpyrocarbonate
<b>DO</b>	Densidad optica
<b>E2m</b>	Elastasa-2 murina
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>ECA2</b>	Enzima convertidora de angiotensina tipo 2
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetraacético
<b>EEM</b>	Error estandar de la media
<b>Egr-1</b>	Proteína 1 de respuesta de crecimiento temprano, de Early growth response protein 1
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-glicol-tetraacético
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares, de Extracellular signal regulated kinase
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ESC</b>	Sociedad Europea de Cardiología
<b>ESH</b>	Sociedad Europea de Hipertensión Arterial
<b>ET1</b>	Endotelina 1
<b>F</b>	Forward
<b>FAC</b>	Federación Argentina de Cardiología
<b>FE</b>	Fenilefrina
<b>FFYB</b>	Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
<b>G</b>	Glomérulo
<b>GADPH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GMPc</b>	Nucleótido guanidina fosfato cíclico
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GWAS</b>	Estudio de Asociación del Genoma, de Genome Wide Association Study
<b>h</b>	Hembra
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HTAe</b>	Hipertensión esencial

<b>IECA</b>	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IDP</b>	Ingesta diaria promedio
<b>IRAP</b>	AminoPeptidasa regulada por insulina, de Insulin Regulated AminoPeptidase
<b>IZiNCG</b>	Grupo de Consulta Internacional sobre Nutrición del Zinc
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal, de c-Jun N-Terminal kinase
<b>KLF5</b>	Factor 5 tipo Krüppel
<b>LT</b>	Longitud de la tibia
<b>m</b>	Macho
<b>MAPK</b>	Proteínquinasa activada por mitógenos, de Mitogen activated protein kinase
<b>MB</b>	Ratas madres que recibieron dieta con bajo contenido en zinc durante la preñez y lactancia
<b>MC</b>	Ratas madres que recibieron dieta control durante la preñez y lactancia
<b>MMP</b>	Metaloproteasas de matriz
<b>MrgD</b>	Receptor tipo Mas acoplado a proteína G, de Mas related G protein coupled receptor
<b>MSAL</b>	Ministerio de Salud de la Nación Argentina
<b>n</b>	Tamaño muestral
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida dinucleótido fosfato oxidado
<b>NADPH</b>	Nicotinamida dinucleótido fosfato reducido
<b>NEP</b>	Neprelisina, de Neutral Propilendopeptidase
<b>NF-κβ</b>	Factor de transcripción nuclear kappa beta
<b>NIH</b>	Instuto de Salud Nacional de los Estados Unidos
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>Nox</b>	Isoformas de la NADPH oxidasa
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OMS</b>	AminoPeptidasa regulada por insulina, de Insulin Regulated AminoPeptidase
<b>p53</b>	Proteína tumoral p53
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAGE</b>	poliacrilamida
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PAU</b>	Peso de las aurículas
<b>Pax-2</b>	Gen 2 de caja pareada, de Paired Box Gene 2
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PC</b>	Peso corporal
<b>pCE50%</b>	Concentración molar requerida para alcanzar el 50% de la respuesta máxima
<b>PCMB</b>	p-Cloromercuribenzoato
<b>Pcor</b>	Peso corazon

<b>PEP</b>	Prolilendopeptidasa
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PKC</b>	Proteínquinasa C
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLZF</b>	Proteína con dedos de zinc de la leucemia promielocítica
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PMSF</b>	Persulfato de amonio
<b>PR</b>	Peso renal
<b>PVD</b>	Peso del ventrículo derecho
<b>PVI</b>	Peso del ventrículo izquierdo
<b>R</b>	Reverse
<b>RAPG</b>	Receptor asociado a proteína G
<b>RCIU</b>	Restricción del crecimiento intrauterino
<b>RENATA</b>	Registro Nacional de Hipertension Arterial
<b>RENATA-2</b>	Registro Nacional de Hipertension Arterial Estudio 2
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RM</b>	Receptor de mineralocorticoides
<b>Rmax</b>	Respuesta máxima
<b>RPR</b>	Receptor de renina-prorenina
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real
<b>SAC</b>	Sociedad Argentina de Cardiología
<b>SDS</b>	dodecilsulfato de sodio
<b>SF</b>	Solución de NaCl al 0,9%, solución fisiológica,
<b>SHR</b>	Ratas espontáneamente hipertensas
<b>Smad</b>	Proteína homóloga a Mad de <i>Drosophila</i> y Sma de <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido único, de Single Nucleotide Polymorphism
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>Sp1</b>	Proteína de especificidad 1, de specificity protein 1
<b>SRA</b>	Sistema renina angiotensina
<b>TD</b>	Túbulo distal
<b>TdT</b>	Enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal
<b>TFG</b>	Tasa de filtrado glomerular
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformador, de Transforming Growth Factor
<b>TIMP</b>	Inhibidor tisular de metaloproteasas
<b>TLR4</b>	Receptor tipo-toll 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TOP</b>	Thimet oligopeptidasa
<b>TP</b>	Túbulo proximal
<b>UNICEF</b>	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, de United Nations Children's Fund
<b>VI</b>	Ventrículo izquierdo
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud, de World Health Organization

---

<b>ZIP</b>	<i>Zrt-, Irt-related Proteins</i> , transportadores de zinc
<b>ZnT</b>	<i>Zinc Transporters</i> , transportadores de zinc

---

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

1. *Hipertensión arterial. Informe de un comité de expertos de la OMS* (Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1978).
2. Whelton, P.K. & Carey, R.M. The 2017 Clinical Practice Guideline for High Blood Pressure. *JAMA* 318, 2073–2074 (2017).
3. Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional*. 7th ed. (Elsevier Saunders, 2007).
4. Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R. & Collins, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality. A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet (London, England)* 360, 1903–1913 (2002).
5. Kannel, W.B. Hypertension as a risk factor for cardiac events--epidemiologic results of long-term studies. *Journal of cardiovascular pharmacology* 21 Suppl 2, S27-37 (1993).
6. Kannel, W.B. Framingham study insights into hypertensive risk of cardiovascular disease. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 18, 181–196 (1995).
7. Organización Mundial de la Salud. Información General sobre la Hipertensión en el Mundo. World Health Organization (2013).
8. Delucchi AM, Majul CR, Vicario A, Cerezo GH, Fábregues G. Registro Nacional de Hipertensión Arterial. Características epidemiológicas de la hipertensión arterial en Argentina. Estudio RENATA 2. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* 46 (2017).
9. Marin M. National Registry of Hypertension. Awareness, Treatment and Control of Hypertension. The RENATA Study. *REV ARGENT CARDIOL* 80, 121-128. (2012).
10. World Health Organization. *A global brief on Hypertension. Silent Killer, global public health crisis* (2013).
11. López-Jaramillo, P. *Manual práctico LASH de diagnóstico y manejo de la HTA en Latinoamérica* (Caduceo Multimedia, [Barcelona], D.L. 2015).
12. Padmanabhan, S., Caulfield, M. & Dominiczak, A.F. Genetic and molecular aspects of hypertension. *Circulation research* 116, 937–959 (2015).
13. Silverthorn, D.U., Johnson, B.R., Ober, W.C., Ober, C.E. & Silverthorn, A.C. *Human physiology. An integrated approach / Dee Unglaub Silverthorn ; with contributions by Bruce R. Johnson and William C. Ober, Claire E. Ober, Andrew C. Silverthorn* (Pearson Education Limited, Harlow, Essex, England, 2016).
14. Page, I.H. The mosaic theory of arterial hypertension--its interpretation. *Perspectives in biology and medicine* 10, 325–333 (1967).
15. Ehret, G.B. & Caulfield, M.J. Genes for blood pressure. An opportunity to understand hypertension. *European heart journal* 34, 951–961 (2013).
16. Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S.R. & Lander, E.S. The mystery of missing heritability. Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1193–1198 (2012).



17. Liang, M., Cowley, A.W., Mattson, D.L., Kotchen, T.A. & Liu, Y. Epigenomics of hypertension. *Seminars in nephrology* 33, 392–399 (2013).
18. Surendran, P. *et al.* Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nature genetics* 48, 1151–1161 (2016).
19. Anand, S.S. *et al.* Adipocyte hypertrophy, fatty liver and metabolic risk factors in South Asians. The Molecular Study of Health and Risk in Ethnic Groups (mol-SHARE). *PloS one* 6, e22112 (2011).
20. Tomat, A.L. & Salazar, F.J. Mechanisms involved in developmental programming of hypertension and renal diseases. Gender differences. *Hormone molecular biology and clinical investigation* 18, 63–77 (2014).
21. Ferrario, C.M. The renin-angiotensin system. Importance in physiology and pathology. *Journal of cardiovascular pharmacology* 15 Suppl 3, S1-5 (1990).
22. Phillips, M.I. & Oliveira, E.M. de. Brain renin angiotensin in disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 86, 715–722 (2008).
23. Bernardi, S., Michelli, A., Zuolo, G., Candido, R. & Fabris, B. Update on RAAS Modulation for the Treatment of Diabetic Cardiovascular Disease. *Journal of diabetes research* 2016, 8917578 (2016).
24. Mascolo, A. *et al.* New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Focus on cardiovascular and neurological diseases. *International journal of cardiology* 227, 734–742 (2017).
25. Kurtz, A. Control of renin synthesis and secretion. *American journal of hypertension* 25, 839–847 (2012).
26. Hall, J.E. *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (Elsevier, Philadelphia, PA, 2016).
27. Nguyen, G. Renin/prorenin receptors. *Kidney international* 69, 1503–1506 (2006).
28. Danser, A.H.J. & Deinum, J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 6, 163–165 (2005).
29. Ortiz-Capisano, M.C., Ortiz, P.A., Harding, P., Garvin, J.L. & Beierwaltes, W.H. Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 49, 162–169 (2007).
30. Carrell, R.W. & Read, R.J. How serpins transport hormones and regulate their release. *Seminars in cell & developmental biology* 62, 133–141 (2017).
31. Clarke, N.E. & Turner, A.J. Angiotensin-converting enzyme 2. The first decade. *International journal of hypertension* 2012, 307315 (2012).
32. Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* 52, 639–672 (2000).
33. Unger, T. & Li, J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS* 5 Suppl 1, S7-10 (2004).
34. Rupérez, M. *et al.* Angiotensin II Increases Connective Tissue Growth Factor in the Kidney. *The American journal of pathology* 163, 1937–1947 (2003).

35. Li, X.C. & Zhuo, J.L. Recent Updates on the Proximal Tubule Renin-Angiotensin System in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Current hypertension reports* 18, 63 (2016).
36. Dupont, A.G. & Brouwers, S. Brain angiotensin peptides regulate sympathetic tone and blood pressure. *Journal of hypertension* 28, 1599–1610 (2010).
37. Mehta, P.K. & Griendling, K.K. Angiotensin II cell signaling. Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology* 292, C82-97 (2007).
38. Gasc, J.M., Shanmugam, S., Sibony, M. & Corvol, P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 24, 531–537 (1994).
39. Matavelli, L.C. & Siragy, H.M. AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *Journal of cardiovascular pharmacology* 65, 226–232 (2015).
40. Tate, C.G. Structural biology. A receptor that might block itself. *Nature* 544, 307–308 (2017).
41. Horiuchi, M., Akishita, M. & Dzau, V.J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 33, 613–621 (1999).
42. Carey, R.M. Update on angiotensin AT2 receptors. *Current opinion in nephrology and hypertension* 26, 91–96 (2017).
43. AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A.M. & Quitterer, U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *The Journal of biological chemistry* 276, 39721–39726 (2001).
44. Gironacci, M.M., Cerniello, F.M., Longo Carbajosa, N.A., Goldstein, J. & Cerrato, B.D. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. *Clinical science (London, England : 1979)* 127, 295–306 (2014).
45. Hrenak, J., Paulis, L. & Simko, F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis. Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *International journal of molecular sciences* 17 (2016).
46. Karamyan, V.T. & Speth, R.C. Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system. Unsolved problems and continuing challenges. *Regulatory peptides* 143, 15–27 (2007).
47. Padia, S.H. *et al.* Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 51, 460–465 (2008).
48. Huber, G., Schuster, F. & Raasch, W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacological research* 125, 72–90 (2017).
49. Li, X.C., Zhang, J. & Zhuo, J.L. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system. Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacological research* 125, 21–38 (2017).
50. Yang, R. *et al.* Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated. *Journal of hypertension* 28, 487–494 (2010).

51. Lew, R.A. *et al.* Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *Journal of neurochemistry* 86, 344–350 (2003).
52. Nagata, S. *et al.* Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochemical and biophysical research communications* 350, 1026–1031 (2006).
53. Ahmad, S. *et al.* Angiotensin-(1-12). A chymase-mediated cellular angiotensin II substrate. *Current hypertension reports* 16, 429 (2014).
54. Ferrario, C.M. *et al.* An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clinical science (London, England: 1979)* 126, 461–469 (2014).
55. Arnold, A.C. *et al.* Angiotensin-(1-12) requires angiotensin converting enzyme and AT1 receptors for cardiovascular actions within the solitary tract nucleus. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299, H763–71 (2010).
56. Cummins, P.M. A new addition to the renin-angiotensin peptide family. ProAngiotensin-12 (PA12). *Cardiovascular research* 82, 7–8 (2009).
57. Westwood, B.M. & Chappell, M.C. Divergent pathways for the angiotensin-(1-12) metabolism in the rat circulation and kidney. *Peptides* 35, 190–195 (2012).
58. Jankowski, V. *et al.* Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 297–302 (2007).
59. Tipnis, S.R. *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* 275, 33238–33243 (2000).
60. Vickers, C. *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* 277, 14838–14843 (2002).
61. Lueder, T.G. von, Atar, D. & Krum, H. Current role of neprilysin inhibitors in hypertension and heart failure. *Pharmacology & therapeutics* 144, 41–49 (2014).
62. Ferrario, C.M. & Chappell, M.C. Novel angiotensin peptides. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 61, 2720–2727 (2004).
63. Ferrario, C.M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). An evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 47, 515–521 (2006).
64. Santos, R.A.S. *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, 8258–8263 (2003).
65. Nguyen Dinh Cat, A. & Touyz, R.M. A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the vascular system. *Peptides* 32, 2141–2150 (2011).
66. Santos, R.A. Angiotensin-(1-7). *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 63, 1138–1147 (2014).

67. Arroja, M.M.C., Reid, E. & McCabe, C. Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke. *Experimental & translational stroke medicine* 8, 8 (2016).
68. Lopez Verrilli, M.A. *et al.* Angiotensin-(1-7) through AT receptors mediates tyrosine hydroxylase degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of neurochemistry* 109, 326–335 (2009).
69. Ferreira, P.M., Souza Dos Santos, R.A. & Campagnole-Santos, M.J. Angiotensin-(3-7) pressor effect at the rostral ventrolateral medulla. *Regulatory peptides* 141, 168–174 (2007).
70. Donoghue, M. *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research* 87, E1-9 (2000).
71. Ocaranza, M.P. *et al.* Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *Journal of hypertension* 32, 771–783 (2014).
72. Simões E Silva, A.C. & Teixeira, M.M. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacological research* 107, 154–162 (2016).
73. Flores-Muñoz, M., Smith, N.J., Haggerty, C., Milligan, G. & Nicklin, S.A. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *The Journal of physiology* 589, 939–951 (2011).
74. Kittana, N. Angiotensin-converting enzyme 2-Angiotensin 1-7/1-9 system. Novel promising targets for heart failure treatment. *Fundamental & clinical pharmacology* 32, 14–25 (2018).
75. Lautner, R.Q. *et al.* Discovery and characterization of alamandine. A novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation research* 112, 1104–1111 (2013).
76. Qaradakhi, T., Apostolopoulos, V. & Zulli, A. Angiotensin (1-7) and Alamandine. Similarities and differences. *Pharmacological research* 111, 820–826 (2016).
77. Balcells, E., Meng, Q.C., Johnson, W.H., Oparil, S. & Dell'Italia, L.J. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts. Methods and species considerations. *The American journal of physiology* 273, H1769-74 (1997).
78. Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K.S., Bumpus, F.M. & Husain, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *The Journal of biological chemistry* 265, 22348–22357 (1990).
79. Dell'Italia, L.J., Collawn, J.F. & Ferrario, C.M. Multifunctional Role of Chymase in Acute and Chronic Tissue Injury and Remodeling. *Circulation research* 122, 319–336 (2018).
80. Veerappan, A. *et al.* Mast cells and exosomes in hyperoxia-induced neonatal lung disease. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 310, L1218-32 (2016).
81. Xie, G. *et al.* Hypoxia-induced angiotensin II by the lactate-chymase-dependent mechanism mediates radioresistance of hypoxic tumor cells. *Scientific reports* 7, 42396 (2017).

82. Fu, L. *et al.* Increased fibroblast chymase production mediates procollagen autophagic digestion in volume overload. *Journal of molecular and cellular cardiology* 92, 1–9 (2016).
83. Singh, V.P., Le, B., Bhat, V.B., Baker, K.M. & Kumar, R. High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293, H939–48 (2007).
84. Singh, V.P., Baker, K.M. & Kumar, R. Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose. Role in extracellular matrix production. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294, H1675–84 (2008).
85. Miyazaki, M. & Takai, S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *Journal of pharmacological sciences* 100, 391–397 (2006).
86. Ahmad, S. *et al.* Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue. *PloS one* 6, e28501 (2011).
87. Becari, C. *et al.* Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. *Journal of cardiovascular pharmacology* 46, 498–504 (2005).
88. McDonald, J.E. *et al.* Vasoconstrictor effect of the angiotensin-converting enzyme-resistant, chymase-specific substrate Pro(11)(D)-Ala(12) angiotensin I in human dorsal hand veins. In vivo demonstration of non-ace production of angiotensin II in humans. *Circulation* 104, 1805–1808 (2001).
89. Santos, C.F., Greene, A.S., Salgado, M.C.O. & Oliveira, E.B. Conversion of renin substrate tetradecapeptide to angiotensin II by rat MAB elastase-2. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 82, 1000–1005 (2004).
90. Paula, C.A., Sousa, M.V., Salgado, M.C. & Oliveira, E.B. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochimica et biophysica acta* 1388, 227–238 (1998).
91. Becari, C., Teixeira, F.R., Oliveira, E.B. & Salgado, M.C.O. Angiotensin-converting enzyme inhibition augments the expression of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301, H565–70 (2011).
92. Choudhary, S., Lu, M., Cui, R. & Brasier, A.R. Involvement of a novel Rac/RhoA guanosine triphosphatase-nuclear factor-kappaB inducing kinase signaling pathway mediating angiotensin II-induced RelA transactivation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21, 2203–2217 (2007).
93. Wolf, G. *et al.* Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney international* 61, 1986–1995 (2002).
94. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Rupérez, M., Suzuki, Y. & Egido, J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16 Suppl 1, 27–33 (2001).

95. Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Rupérez, M., Blanco, J. & Egido, J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney. Role of AT(1) and AT(2) receptors. *The American journal of pathology* 158, 1743–1756 (2001).
96. Pandey, A., Goru, S.K., Kadakol, A., Malek, V. & Gaikwad, A.B. Differential regulation of angiotensin converting enzyme 2 and nuclear factor- $\kappa$ B by angiotensin II receptor subtypes in type 2 diabetic kidney. *Biochimie* 118, 71–81 (2015).
97. Brasier, A.R. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovascular toxicology* 6, 111–130 (2006).
98. Cardozo, A.K. *et al.* A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 48879–48886 (2001).
99. Ruiz-Ortega, M. *et al.* Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney international. Supplement*, S12–22 (2002).
100. Lv, J., Chen, Q., Shao, Y., Chen, Y. & Shi, J. Cross-talk between angiotensin-II and toll-like receptor 4 triggers a synergetic inflammatory response in rat mesangial cells under high glucose conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 459, 264–269 (2015).
101. Nair, A.R., Ebenezer, P.J., Saini, Y. & Francis, J. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. *Experimental cell research* 335, 238–247 (2015).
102. Barath, P. *et al.* Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *The American journal of cardiology* 65, 297–302 (1990).
103. Bhatt, S.R., Lokhandwala, M.F. & Banday, A.A. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 36, 367–373 (2014).
104. Liu, D., Gao, L., Roy, S.K., Cornish, K.G. & Zucker, I.H. Role of oxidant stress on AT1 receptor expression in neurons of rabbits with heart failure and in cultured neurons. *Circulation research* 103, 186–193 (2008).
105. Mitra, A.K., Gao, L. & Zucker, I.H. Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression. Sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *American journal of physiology. Cell physiology* 299, C561-9 (2010).
106. Heinemeyer, T. *et al.* Databases on transcriptional regulation. TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic acids research* 26, 362–367 (1998).
107. Cowling, R.T., Gurantz, D., Peng, J., Dillmann, W.H. & Greenberg, B.H. Transcription factor NF-kappa B is necessary for up-regulation of type 1 angiotensin II receptor mRNA in rat cardiac fibroblasts treated with tumor necrosis factor-alpha or interleukin-1 beta. *The Journal of biological chemistry* 277, 5719–5724 (2002).
108. Haack, K.K.V., Mitra, A.K. & Zucker, I.H. NF- $\kappa$ B and CREB are required for angiotensin II type 1 receptor upregulation in neurons. *PloS one* 8, e78695 (2013).

109. Intengan, H.D. & Schiffrin, E.L. Vascular remodeling in hypertension. Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 38, 581–587 (2001).
110. Touyz, R.M., He, G., El Mabrouk, M. & Schiffrin, E.L. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 37, 574–580 (2001).
111. Li, Q., Muragaki, Y., Hatamura, I., Ueno, H. & Ooshima, A. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *Journal of vascular research* 35, 93–103 (1998).
112. Deguchi, J., Makuuchi, M., Nakaoka, T., Collins, T. & Takuwa, Y. Angiotensin II stimulates platelet-derived growth factor-B chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through Ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-Jun N-terminal protein kinase mechanisms. *Circulation research* 85, 565–574 (1999).
113. Levy, B.I. *et al.* Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *The Journal of clinical investigation* 98, 418–425 (1996).
114. Montezano, A.C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F.J. & Touyz, R.M. Angiotensin II and vascular injury. *Current hypertension reports* 16, 431 (2014).
115. Wollert, K. The renin–angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular research* 43, 838–849 (1999).
116. Opie, L.H., Commerford, P.J., Gersh, B.J. & Pfeffer, M.A. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet (London, England)* 367, 356–367 (2006).
117. Opie, L.H. Cellular basis for therapeutic choices in heart failure. *Circulation* 110, 2559–2561 (2004).
118. Bueno, O.F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* 19, 6341–6350 (2000).
119. Rose, B.A., Force, T. & Wang, Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart. Angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiological reviews* 90, 1507–1546 (2010).
120. Brasier, A.R., Jamaluddin, M., Han, Y., Patterson, C. & Runge, M.S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Molecular and cellular biochemistry* 212, 155–169 (2000).
121. Rosenkranz, S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovascular research* 63, 423–432 (2004).
122. Lim, H. & Zhu, Y.Z. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 2584–2596 (2006).
123. Sriramula, S. & Francis, J. Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling. Role for Oxidative Stress. *PLoS one* 10, e0138372 (2015).

124. Siwik, D.A. & Colucci, W.S. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart failure reviews* 9, 43–51 (2004).
125. Burgoyne, J.R., Mongue-Din, H., Eaton, P. & Shah, A.M. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circulation research* 111, 1091–1106 (2012).
126. Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease. Rationale and therapeutic approaches. *Annual review of pharmacology and toxicology* 47, 211–242 (2007).
127. Deschamps, A.M. & Spinale, F.G. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure. Bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovascular research* 69, 666–676 (2006).
128. Briones, A.M. & Touyz, R.M. Oxidative stress and hypertension. Current concepts. *Current hypertension reports* 12, 135–142 (2010).
129. Rizzi, E. *et al.* Tempol inhibits TGF- $\beta$  and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. *International journal of cardiology* 165, 165–173 (2013).
130. Sag, C.M., Santos, C.X.C. & Shah, A.M. Redox regulation of cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 73, 103–111 (2014).
131. Belo, V.A., Guimarães, D.A. & Castro, M.M. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *Journal of vascular research* 52, 221–231 (2015).
132. Sárman, B. *et al.* Nuclear factor-kappaB signaling contributes to severe, but not moderate, angiotensin II-induced left ventricular remodeling. *Journal of hypertension* 25, 1927–1939 (2007).
133. Luchtefeld, M. *et al.* Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications* 328, 183–188 (2005).
134. Cau, S.B.A. *et al.* The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 117, 234–241 (2015).
135. Haudek, S.B. *et al.* Monocytic fibroblast precursors mediate fibrosis in angiotensin-II-induced cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49, 499–507 (2010).
136. Pellieux, C., Montessuit, C., Papageorgiou, I. & Lerch, R. Angiotensin II downregulates the fatty acid oxidation pathway in adult rat cardiomyocytes via release of tumour necrosis factor-alpha. *Cardiovascular research* 82, 341–350 (2009).
137. Sriramula, S., Haque, M., Majid, D.S.A. & Francis, J. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 51, 1345–1351 (2008).



138. Berk, B.C., Fujiwara, K. & Lehoux, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation* 117, 568–575 (2007).
139. Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H.M. & Schlüter, K.D. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2291–2293 (2001).
140. Zhao, Q.D. *et al.* NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFκB signaling pathways. *Circulation* 131, 643–655 (2015).
141. Chen, K., Mehta, J.L., Li, D., Joseph, L. & Joseph, J. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circulation research* 95, 1167–1173 (2004).
142. Li, X. *et al.* Overexpression of SerpinE2/protease nexin-1 Contribute to Pathological Cardiac Fibrosis via increasing Collagen Deposition. *Scientific reports* 6, 37635 (2016).
143. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 55–71 (2010).
144. Spinale, F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases. Influence on cardiac form and function. *Physiological reviews* 87, 1285–1342 (2007).
145. Donnini, S. *et al.* Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *FEBS letters* 582, 1135–1140 (2008).
146. Kandasamy, A.D., Chow, A.K., Ali, M.A.M. & Schulz, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury. Beyond the matrix. *Cardiovascular research* 85, 413–423 (2010).
147. Ramires, F.J., Sun, Y. & Weber, K.T. Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration. Attenuation by calcium channel blockade. *Journal of molecular and cellular cardiology* 30, 475–483 (1998).
148. Johar, S., Cave, A.C., Narayanapanicker, A., Grieve, D.J. & Shah, A.M. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 1546–1548 (2006).
149. Ruiz-Ortega, M. & Egido, J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney international* 52, 1497–1510 (1997).
150. Johnston, C.I. Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system. A dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 10, S13–26 (1992).
151. Dzau, V.J. & Re, R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation* 89, 493–498 (1994).

152. Nguyen Dinh Cat, A. & Touyz, R.M. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone. Novel mechanisms. *Current hypertension reports* 13, 122–128 (2011).
153. Mello, W.C. de. Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases. *The Medical clinics of North America* 101, 117–127 (2017).
154. Mancia, G. *et al.* 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension* 25, 1105–1187 (2007).
155. Romero, C.A., Orias, M. & Weir, M.R. Novel RAAS agonists and antagonists. Clinical applications and controversies. *Nature reviews. Endocrinology* 11, 242–252 (2015).
156. Carey, R.M. & Siragy, H.M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system. Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews* 24, 261–271 (2003).
157. Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews* 86, 747–803 (2006).
158. Kurdi, M., Mello, W.C. de & Booz, G.W. Working outside the system. An update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1357–1367 (2005).
159. Danser, A.H. *et al.* Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 24, 37–48 (1994).
160. Lannoy, L.M. de, Danser, A.J.H., Bouhuizen, A.M.B., Saxena, P.R. & Schalekamp, M.A.D.H. Localization and Production of Angiotensin II in the Isolated Perfused Rat Heart. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 31, 1111–1117 (1998).
161. Serneri, G.G.N. *et al.* Cardiac Angiotensin II Formation in the Clinical Course of Heart Failure and Its Relationship With Left Ventricular Function. *Circulation research* 88, 961–968 (2001).
162. van Kats, J.P., Methot, D., Paradis, P., Silversides, D.W. & Reudelhuber, T.L. Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart. *The Journal of biological chemistry* 276, 44012–44017 (2001).
163. Xu, J. *et al.* Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299, H1328–38 (2010).
164. Ingelfinger, J.R. *et al.* Intrarenal angiotensinogen. Localization and regulation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 4, 424–428 (1990).
165. Navar, L.G. & Nishiyama, A. Intrarenal formation of angiotensin II. *Contributions to nephrology*, 1–15 (2001).

166. Navar, L.G., Lewis, L., Hymel, A., Braam, B. & Mitchell, K.D. Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 5, 1153–1158 (1994).
167. Urushihara, M. & Kagami, S. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of renal disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* (2016).
168. Schunkert, H. *et al.* Regulation of intrarenal and circulating renin-angiotensin systems in severe heart failure in the rat. *Cardiovascular research* 27, 731–735 (1993).
169. Guron, G. & Friberg, P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *Journal of hypertension* 18, 123–137 (2000).
170. Norwood, V.F., Craig, M.R., Harris, J.M. & Gomez, R.A. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *The American journal of physiology* 272, R662-8 (1997).
171. Guron, G., Marcussen, N., Nilsson, A., Sundelin, B. & Friberg, P. Postnatal time frame for renal vulnerability to enalapril in rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10, 1550–1560 (1999).
172. Madsen, K., Tinning, A.R., Marcussen, N. & Jensen, B.L. Postnatal development of the renal medulla; role of the renin-angiotensin system. *Acta physiologica (Oxford, England)* 208, 41–49 (2013).
173. Aguilera, G., Kapur, S., Feuillan, P., Sunar-Akbasak, B. & Bathia, A.J. Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney international* 46, 973–979 (1994).
174. Tufro-McReddie, A., Harrison, J.K., Everett, A.D. & Gomez, R.A. Ontogeny of type 1 angiotensin II receptor gene expression in the rat. *The Journal of clinical investigation* 91, 530–537 (1993).
175. Madsen, K. *et al.* Angiotensin II promotes development of the renal microcirculation through AT1 receptors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 448–459 (2010).
176. Iosipiv, I.V. & Schroeder, M. A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching. *American journal of physiology. Renal physiology* 285, F199–207 (2003).
177. Wolf, G. Angiotensin II and tubular development. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 17 Suppl 9, 48–51 (2002).
178. Woods, L.L. & Rasch, R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *The American journal of physiology* 275, R1593-9 (1998).
179. Tsuchida, S. *et al.* Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *The Journal of clinical investigation* 101, 755–760 (1998).
180. Guron, G., Adams, M.A., Sundelin, B. & Friberg, P. Neonatal angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat induces persistent abnormalities in renal function and histology. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 29, 91–97 (1997).

181. Saez, F. *et al.* Sex differences in the renal changes elicited by angiotensin II blockade during the nephrogenic period. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 49, 1429–1435 (2007).
182. Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J. & Kobilka, B.K. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744–747 (1995).
183. Friberg, P. *et al.* Renin-angiotensin system in neonatal rats. Induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney international* 45, 485–492 (1994).
184. Grigore, D., Ojeda, N.B. & Alexander, B.T. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gender medicine* 5 Suppl A, S121-32 (2008).
185. Goyal, R. *et al.* Maternal protein deprivation. Changes in systemic renin-angiotensin system of the mouse fetus. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 16, 894–904 (2009).
186. Langley-Evans, S.C., Welham, S.J. & Jackson, A.A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life sciences* 64, 965–974 (1999).
187. Roghair, R.D. *et al.* Late-gestation betamethasone enhances coronary artery responsiveness to angiotensin II in fetal sheep. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286, R80-8 (2004).
188. Yan, J., Li, X., Su, R., Zhang, K. & Yang, H. Long-term effects of maternal diabetes on blood pressure and renal function in rat male offspring. *PloS one* 9, e88269 (2014).
189. Woods, L.L., Ingelfinger, J.R., Nyengaard, J.R. & Rasch, R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric research* 49, 460–467 (2001).
190. Wang, Y.-P. *et al.* Effects of a restricted fetal growth environment on human kidney morphology, cell apoptosis and gene expression. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 16, 1028–1035 (2015).
191. Barker, D.J. & Osmond, C. Low birth weight and hypertension. *BMJ (Clinical research ed.)* 297, 134–135 (1988).
192. Bateson, P. *et al.* Developmental plasticity and human health. *Nature* 430, 419–421 (2004).
193. McMillen, I.C. & Robinson, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome. Prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews* 85, 571–633 (2005).
194. Goyal, R., Van-Wickle, J., Goyal, D. & Longo, L.D. Antenatal maternal low protein diet. ACE-2 in the mouse lung and sexually dimorphic programming of hypertension. *BMC physiology* 15, 2 (2015).
195. Bertagnolli, M. Preterm Birth and Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Evidences of Activation and Impact on Chronic Cardiovascular Disease Risks. *Protein and peptide letters* 24, 793–798 (2017).

196. Kett, M.M. & Denton, K.M. Renal programming. Cause for concern? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 300, R791-803 (2011).
197. Kranch-Shorthouse, R.A. *et al.* Ovine uterine space restriction causes dysregulation of the renin-angiotensin system in fetal kidneys. *Biology of reproduction* 96, 211–220 (2017).
198. Ferdous, F. *et al.* Fetal growth restriction in rural Bangladesh. A prospective study. *Tropical medicine and health* 46, 3 (2018).
199. Crispi, F., Miranda, J. & Gratacós, E. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction. Biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. *American journal of obstetrics and gynecology* 218, S869-S879 (2018).
200. Woodall, S.M., Johnston, B.M., Breier, B.H. & Gluckman, P.D. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatric research* 40, 438–443 (1996).
201. Langley, S.C. & Jackson, A.A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin. Sci.* 86, 217-22; discussion 121 (1994).
202. Gilbert, J.S., Lang, A.L., Grant, A.R. & Nijland, M.J. Maternal nutrient restriction in sheep. Hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *The Journal of physiology* 565, 137–147 (2005).
203. Longo, L.D. & Pearce, W.J. Fetal cerebrovascular acclimatization responses to high-altitude, long-term hypoxia. A model for prenatal programming of adult disease? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288, R16-24 (2005).
204. Zhang, D.Y. *et al.* Effects of placental insufficiency on the ovine fetal renin-angiotensin system. *Experimental physiology* 85, 79–84 (2000).
205. Bassan, H. *et al.* Experimental intrauterine growth retardation alters renal development. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 15, 192–195 (2000).
206. Benediktsson, R., Lindsay, R.S., Noble, J., Seckl, J.R. & Edwards, C.R. Glucocorticoid exposure in utero. New model for adult hypertension. *Lancet (London, England)* 341, 339–341 (1993).
207. Lindsay, R.S., Lindsay, R.M., Waddell, B.J. & Seckl, J.R. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat. Studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 39, 1299–1305 (1996).
208. Cuffe, J.S.M., Burgess, D.J., O'Sullivan, L., Singh, R.R. & Moritz, K.M. Maternal corticosterone exposure in the mouse programs sex-specific renal adaptations in the renin-angiotensin-aldosterone system in 6-month offspring. *Physiological reports* 4 (2016).
209. Lewis, R.M., Doherty, C.B., James, L.A., Burton, G.J. & Hales, C.N. Effects of maternal iron restriction on placental vascularization in the rat. *Placenta* 22, 534–539 (2001).

210. Gambling, L. *et al.* Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *The Journal of physiology* 552, 603–610 (2003).
211. Ghosh, P., Bitsanis, D., Ghebremeskel, K., Crawford, M.A. & Poston, L. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *The Journal of physiology* 533, 815–822 (2001).
212. Khan, I.Y. *et al.* Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 41, 168–175 (2003).
213. Ozaki, T., Nishina, H., Hanson, M.A. & Poston, L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *The Journal of physiology* 530, 141–152 (2001).
214. Sathishkumar, K., Elkins, R., Yallampalli, U. & Yallampalli, C. Protein restriction during pregnancy induces hypertension in adult female rat offspring--influence of oestradiol. *The British journal of nutrition* 107, 665–673 (2012).
215. Alexander, B.T. Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 41, 457–462 (2003).
216. Alexander, B.T. & Ojeda, N.B. Prenatal inflammation and the early origins of hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 35, 1403–1404 (2008).
217. Anderson, C.M., Lopez, F., Zimmer, A. & Benoit, J.N. Placental insufficiency leads to developmental hypertension and mesenteric artery dysfunction in two generations of Sprague-Dawley rat offspring. *Biology of reproduction* 74, 538–544 (2006).
218. Waterland, R.A. & Garza, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition* 69, 179–197 (1999).
219. Waterland, R.A. & Jirtle, R.L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 20, 63–68 (2004).
220. Brenner, B.M. & Chertow, G.M. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 23, 171–175 (1994).
221. Brenner, B.M., Garcia, D.L. & Anderson, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *American journal of hypertension* 1, 335–347 (1988).
222. Hughson, M., Farris, A.B., Douglas-Denton, R., Hoy, W.E. & Bertram, J.F. Glomerular number and size in autopsy kidneys. The relationship to birth weight. *Kidney international* 63, 2113–2122 (2003).
223. Zandi-Nejad, K., Luyckx, V.A. & Brenner, B.M. Adult hypertension and kidney disease. The role of fetal programming. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 47, 502–508 (2006).

224. Black, M.J., Briscoe, T.A., Constantinou, M., Kett, M.M. & Bertram, J.F. Is there an association between level of adult blood pressure and nephron number or renal filtration surface area? *Kidney international* 65, 582–588 (2004).
225. Vehaskari, V.M., Aviles, D.H. & Manning, J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney international* 59, 238–245 (2001).
226. Pham, T.D. *et al.* Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 285, R962-70 (2003).
227. Keen, C.L. *et al.* Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents. Acute and long-term effects. *The Journal of nutrition* 133, 1477S-80S (2003).
228. Alexander, B.T. Fetal programming of hypertension. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290, R1-R10 (2006).
229. Petry, C.J. & Hales, C.N. Long-term effects on offspring of intrauterine exposure to deficits in nutrition. *Human reproduction update* 6, 578–586 (2000).
230. Mamet, J. *et al.* Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat. *Pediatric research* 51, 207–214 (2002).
231. Franco, M.d.C.P. *et al.* Intrauterine undernutrition. Expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovascular research* 56, 145–153 (2002).
232. Franco, M.d.C.P. *et al.* Severe nutritional restriction in pregnant rats aggravates hypertension, altered vascular reactivity, and renal development in spontaneously hypertensive rats offspring. *Journal of cardiovascular pharmacology* 39, 369–377 (2002).
233. Franco, M.d.C.P. *et al.* Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration. *Journal of cardiovascular pharmacology* 42, 211–217 (2003).
234. Aiken, C.E. & Ozanne, S.E. Transgenerational developmental programming. *Human reproduction update* 20, 63–75 (2014).
235. Ojeda, N.B., Grigore, D., Robertson, E.B. & Alexander, B.T. Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 50, 679–685 (2007).
236. Ojeda, N.B. *et al.* Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292, R758-63 (2007).
237. Woods, L.L., Ingelfinger, J.R. & Rasch, R. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289, R1131-6 (2005).
238. Loria, A. *et al.* Sex and age differences of renal function in rats with reduced ANG II activity during the nephrogenic period. *American journal of physiology. Renal physiology* 293, F506-10 (2007).

239. Gallou-Kabani, C. *et al.* Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS one* 5, e14398 (2010).
240. Mao, C. *et al.* Changes of renal AT1/AT2 receptors and structures in ovine fetuses following exposure to long-term hypoxia. *American journal of nephrology* 31, 141–150 (2010).
241. Kwong, W.Y., Wild, A.E., Roberts, P., Willis, A.C. & Fleming, T.P. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development (Cambridge, England)* 127, 4195–4202 (2000).
242. Ojeda, N.B. *et al.* Enhanced sensitivity to acute angiotensin II is testosterone dependent in adult male growth-restricted offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 298, R1421-7 (2010).
243. Ojeda, N.B. *et al.* Hypersensitivity to acute ANG II in female growth-restricted offspring is exacerbated by ovariectomy. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 301, R1199-205 (2011).
244. Loria, A.S., Yamamoto, T., Pollock, D.M. & Pollock, J.S. Early life stress induces renal dysfunction in adult male rats but not female rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 304, R121-9 (2013).
245. Xiao, D. *et al.* Prenatal gender-related nicotine exposure increases blood pressure response to angiotensin II in adult offspring. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 51, 1239–1247 (2008).
246. Woods, L.L., Weeks, D.A. & Rasch, R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction. Role of nephrogenesis. *Kidney international* 65, 1339–1348 (2004).
247. Wilcoxon, J.S., Schwartz, J., Aird, F. & Redei, E.E. Sexually dimorphic effects of maternal alcohol intake and adrenalectomy on left ventricular hypertrophy in rat offspring. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285, E31-9 (2003).
248. Rickard, I.J., Russell, A.F. & Lummaa, V. Producing sons reduces lifetime reproductive success of subsequent offspring in pre-industrial Finns. *Proceedings. Biological sciences* 274, 2981–2988 (2007).
249. Mathews, F., Johnson, P.J. & Neil, A. You are what your mother eats. Evidence for maternal preconception diet influencing foetal sex in humans. *Proceedings. Biological sciences* 275, 1661–1668 (2008).
250. Intapad, S., Ojeda, N.B., Dasinger, J.H. & Alexander, B.T. Sex differences in the developmental origins of cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda, Md.)* 29, 122–132 (2014).
251. Grigore, D. *et al.* Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293, R804-11 (2007).



252. Moritz, K.M. *et al.* Uteroplacental insufficiency causes a nephron deficit, modest renal insufficiency but no hypertension with ageing in female rats. *The Journal of physiology* 587, 2635–2646 (2009).
253. Wlodek, M.E. *et al.* Normal lactational environment restores nephron endowment and prevents hypertension after placental restriction in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 1688–1696 (2007).
254. McMullen, S., Gardner, D.S. & Langley-Evans, S.C. Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *The British journal of nutrition* 91, 133–140 (2004).
255. Yanes, L.L. *et al.* Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 296, F771-9 (2009).
256. Brosnihan, K.B., Li, P., Ganten, D. & Ferrario, C.M. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *The American journal of physiology* 273, R1908-15 (1997).
257. Sampson, A.K. *et al.* Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 52, 666–671 (2008).
258. Sandberg, K. & Ji, H. Sex and the renin angiotensin system. Implications for gender differences in the progression of kidney disease. *Advances in renal replacement therapy* 10, 15–23 (2003).
259. Ojeda, N.B. *et al.* Oxidative stress contributes to sex differences in blood pressure in adult growth-restricted offspring. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 60, 114–122 (2012).
260. Stewart, T., Jung, F.F., Manning, J. & Vehaskari, V.M. Kidney immune cell infiltration and oxidative stress contribute to prenatally programmed hypertension. *Kidney international* 68, 2180–2188 (2005).
261. Xiao, D., Huang, X., Yang, S. & Zhang, L. Estrogen normalizes perinatal nicotine-induced hypertensive responses in adult female rat offspring. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 61, 1246–1254 (2013).
262. Webster, A.L.H., Yan, M.S.-C. & Marsden, P.A. Epigenetics and cardiovascular disease. *The Canadian journal of cardiology* 29, 46–57 (2013).
263. Goyal, R., Goyal, D., Leitzke, A., Gheorghe, C.P. & Longo, L.D. Brain renin-angiotensin system. Fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 17, 227–238 (2010).
264. Bogdarina, I., Welham, S., King, P.J., Burns, S.P. & Clark, A.J.L. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circulation research* 100, 520–526 (2007).
265. Baserga, M. *et al.* Fetal growth restriction alters transcription factor binding and epigenetic mechanisms of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a sex-specific manner. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 299, R334-42 (2010).

266. Arranz CT. Orígenes fetales de las enfermedades cardiovasculares en la vida adulta por deficiencia de micronutrientes. *Clin Invest Arterioscl* 24(2), 71–81 (2012).
267. Amoroso, L. The Second International Conference on Nutrition. Implications for Hidden Hunger. *World review of nutrition and dietetics* 115, 142–152 (2016).
268. Delgado H, M.L. Taller transición nutricional en América Latina. Actas del Congreso Latinoamericano de Nutrición, 16–19 (2001).
269. Britos S. ¿Más comida o mejor calidad? *Actualización en Nutrición* 6 (2005).
270. Black, R.E. *et al.* Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet (London, England)* 382, 427–451 (2013).
271. Shah, D. & Sachdev, H.P.S. Zinc deficiency in pregnancy and fetal outcome. *Nutrition reviews* 64, 15–30 (2006).
272. Tomat, A.L. *et al.* Moderate zinc deficiency influences arterial blood pressure and vascular nitric oxide pathway in growing rats. *Pediatric research* 58, 672–676 (2005).
273. Tomat, A.L. *et al.* Zinc deficiency during growth. Influence on renal function and morphology. *Life sciences* 80, 1292–1302 (2007).
274. World Health Organization. The World Health Report. World Health Organization (2002).
275. Wessells, K.R. & Brown, K.H. Estimating the global prevalence of zinc deficiency. Results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PloS one* 7, e50568 (2012).
276. Ministerio de Salud de la Nación, Argentina. *Encuesta nacional de Nutrición y Salud (ENNyS)* (2007).
277. Durán, P. *et al.* Índice de masa corporal y tensión arterial al año de edad según peso al nacer, ganancia de peso y patrones de alimentación temprana. *Archivos argentinos de pediatría* 109, 392–397 (2011).
278. Prasad, A.S. Zinc deficiency in women, infants and children. *Journal of the American College of Nutrition* 15, 113–120 (1996).
279. Benoist, B. de, Darnton-Hill, I., Davidsson, L., Fontaine, O. & Hotz, C. Conclusions of the Joint WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG Interagency Meeting on Zinc Status Indicators. *Food and nutrition bulletin* 28, S480-4 (2007).
280. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A. & Itsumura, N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiological reviews* 95, 749–784 (2015).
281. Vallee, B.L. & Falchuk, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews* 73, 79–118 (1993).
282. Wise, A. Phytate and zinc bioavailability. *International journal of food sciences and nutrition* 46, 53–63 (1995).
283. Sandström, B. Bioavailability of zinc. *European journal of clinical nutrition* 51 Suppl 1, S17-9 (1997).
284. McMahon, R.J. & Cousins, R.J. Mammalian zinc transporters. *The Journal of nutrition* 128, 667–670 (1998).

285. Blaby-Haas, C.E. & Merchant, S.S. Lysosome-related organelles as mediators of metal homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 289, 28129–28136 (2014).
286. Kimura, T. & Kambe, T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters. An Overview and Perspective. *International journal of molecular sciences* 17, 336 (2016).
287. Pfaffl, M.W. & Windisch, W. Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 17, 97–106 (2003).
288. McMahon, R.J. & Cousins, R.J. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4841–4846 (1998).
289. Beattie, J.H. & Kwun, I.-S. Is zinc deficiency a risk factor for atherosclerosis? *The British journal of nutrition* 91, 177–181 (2004).
290. Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S. & Poos, M. Dietary reference intakes. Vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association* 101, 294–301 (2001).
291. Armah, S.M. Fractional Zinc Absorption for Men, Women, and Adolescents Is Overestimated in the Current Dietary Reference Intakes. *The Journal of nutrition* 146, 1276–1280 (2016).
292. Gibson, R.S., Hess, S.Y., Hotz, C. & Brown, K.H. Indicators of zinc status at the population level. A review of the evidence. *The British journal of nutrition* 99 Suppl 3, S14-23 (2008).
293. Pita Martín de Portela ML. *Aspectos nutricionales de vitaminas y minerales en el siglo XXI. Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios – AATA* (2015).
294. Homma, K. *et al.* SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Molecular cell* 52, 75–86 (2013).
295. Meier, C.A. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Journal of receptor and signal transduction research* 17, 319–335 (1997).
296. Cousins, R.J. Nutritional regulation of gene expression. *The American journal of medicine* 106, 20S-23S; discussion 50S-51S (1999).
297. O'Dell, B.L. Role of zinc in plasma membrane function. *The Journal of nutrition* 130, 1432S-6S (2000).
298. Clayton, D. *et al.* Structural determinants for binding to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin receptors 1 and 2. *Frontiers in pharmacology* 6, 5 (2015).
299. Daff, S. NO synthase. Structures and mechanisms. *Nitric oxide : biology and chemistry* 23, 1–11 (2010).
300. Ishikawa, Y. *et al.* Down regulation by a low-zinc diet in gene expression of rat prostatic thymidylate synthase and thymidine kinase. *Nutrition & metabolism* 5, 12 (2008).

301. Hamza, R.T., Hamed, A.I. & Sallam, M.T. Effect of zinc supplementation on growth hormone-insulin growth factor axis in short Egyptian children with zinc deficiency. *Italian journal of pediatrics* 38, 21 (2012).
302. Meerarani, P. *et al.* Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *The American journal of clinical nutrition* 71, 81–87 (2000).
303. Jomova, K. & Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87 (2011).
304. Noh, S.K. & Koo, S.I. Feeding of a low-zinc diet lowers the tissue concentrations of alpha-tocopherol in adult rats. *Biological trace element research* 81, 153–168 (2001).
305. Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A. & Santillo, M. The Cu, Zn Superoxide Dismutase. Not Only a Dismutase Enzyme. *Frontiers in physiology* 7, 594 (2016).
306. Zhao, Y. *et al.* Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicology letters* 200, 100–106 (2011).
307. White, C.L., Pschorr, J., Jacob, I.C., Lutterotti, N. von & Dahlheim, H. The effect of zinc in vivo and in vitro on the activities of angiotensin converting enzyme and kininase-I in the plasma of rats. *Biochemical pharmacology* 35, 2489–2493 (1986).
308. Reeves, P.G. & O'Dell, B.L. An experimental study of the effect of zinc on the activity of angiotensin converting enzyme in serum. *Clinical chemistry* 31, 581–584 (1985).
309. Schanz, M. *et al.* Renal effects of metallothionein induction by zinc in vitro and in vivo. *BMC nephrology* 18, 91 (2017).
310. Reeves, P.G. & O'Dell, B.L. Effects of Dietary Zinc Deprivation on the Activity of Angiotensin-Converting Enzyme in Serum of Rats and Guinea Pigs. *The Journal of nutrition* 116, 128–134 (1986).
311. Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K. & Librowski, T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology* 25, 11–24 (2017).
312. Reeves, P.G. & O'Dell, B.L. Zinc Deficiency in Rats and Angiotensin-Converting Enzyme Activity. Comparative Effects on Lung and Testis. *The Journal of nutrition* 118, 622–626 (1988).
313. Sarukura, N. *et al.* Effects of dietary zinc deprivation on zinc concentration and ratio of apo/holo-activities of angiotensin converting enzyme in serum of mice. *Auris, nasus, larynx* 39, 294–297 (2012).
314. Thiel, G. & Rössler, O.G. Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 152, 4211–4223 (2011).
315. Tan, N.Y. *et al.* Angiotensin II-inducible platelet-derived growth factor-D transcription requires specific Ser/Thr residues in the second zinc finger region of Sp1. *Circulation research* 102, e38-51 (2008).

316. Oishi, Y. *et al.* Regulatory polymorphism in transcription factor KLF5 at the MEF2 element alters the response to angiotensin II and is associated with human hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1780–1788 (2010).
317. Senbonmatsu, T. *et al.* A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway. Possible role in cardiac hypertrophy. *The EMBO journal* 22, 6471–6482 (2003).
318. Seidel, K. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein exerts neuroprotective effects in neuronal cells and is dysregulated in experimental stroke. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 21, 31–43 (2011).
319. Afridi, H.I. *et al.* Interaction between essential elements selenium and zinc with cadmium and mercury in samples from hypertensive patients. *Biological trace element research* 160, 185–196 (2014).
320. Little, P.J., Bhattacharya, R., Moreyra, A.E. & Korichneva, I.L. Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 26, 1050–1057 (2010).
321. Tomat, A.L., Costa, M.d.l.Á. & Arranz, C.T. Zinc restriction during different periods of life. Influence in renal and cardiovascular diseases. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 27, 392–398 (2011).
322. Chasapis, C.T., Loutsidou, A.C., Spiliopoulou, C.A. & Stefanidou, M.E. Zinc and human health. An update. *Archives of toxicology* 86, 521–534 (2012).
323. Ahmadi, R., Ziaei, S. & Parsay, S. Association between Nutritional Status with Spontaneous Abortion. *International journal of fertility & sterility* 10, 337–342 (2017).
324. Terrin, G. *et al.* Zinc supplementation reduces morbidity and mortality in very-low-birth-weight preterm neonates. A hospital-based randomized, placebo-controlled trial in an industrialized country. *The American journal of clinical nutrition* 98, 1468–1474 (2013).
325. Tomat, A.L. *et al.* Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats. Effects on adult arterial blood pressure and kidney. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 295, R543-9 (2008).
326. Tomat, A.L. *et al.* Mild zinc deficiency in male and female rats. Early postnatal alterations in renal nitric oxide system and morphology. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 29, 568–573 (2013).
327. Tomat, A. *et al.* Exposure to zinc deficiency in fetal and postnatal life determines nitric oxide system activity and arterial blood pressure levels in adult rats. *The British journal of nutrition* 104, 382–389 (2010).
328. Abregú, F.M.G. *et al.* Developmental programming of vascular dysfunction by prenatal and postnatal zinc deficiency in male and female rats. *The Journal of nutritional biochemistry* (2018).
329. Tomat, A.L. *et al.* Morphological and functional effects on cardiac tissue induced by moderate zinc deficiency during prenatal and postnatal life in male and

- female rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 305, H1574-83 (2013).
330. Juriol, L.V. *et al.* Cardiac changes in apoptosis, inflammation, oxidative stress, and nitric oxide system induced by prenatal and postnatal zinc deficiency in male and female rats. *European journal of nutrition* (2016).
331. Sapp, R.E. & Davidson, S.D. Microwave digestion of multi-component foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry. *J Food Science* 56(5), 1412–1414 (1991).
332. Junqueira, L.C., Bignolas, G. & Brentani, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal* 11, 447–455 (1979).
333. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 119, 493–501 (1992).
334. Gironacci, M.M. *et al.* Increased hypothalamic angiotensin-(1-7) levels in rats with aortic coarctation-induced hypertension. *Peptides* 28, 1580–1585 (2007).
335. Coelho, M.S. *et al.* High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regulatory peptides* 162, 61–67 (2010).
336. Garcia del Moral, R. *Laboratorio de anatomía patológica* (Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, 1993).
337. Karnik, S.S. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors. Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli corrected. *Pharmacological reviews* 67, 754–819 (2015).
338. Kubista, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95–125 (2006).
339. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254 (1976).
340. Giani, J.F. *et al.* Upregulation of the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis in the heart and the kidney of growth hormone receptor knock-out mice. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 22, 224–233 (2012).
341. Giani, J.F. *et al.* Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 298, H1003-13 (2010).
342. Nauseef, W.M. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 757–767 (2014).
343. Litterio, M.C. *et al.* (-)-Epicatechin reduces blood pressure increase in high-fructose-fed rats. Effects on the determinants of nitric oxide bioavailability. *The Journal of nutritional biochemistry* 26, 745–751 (2015).

344. Kalea, A.Z. *et al.* Alternatively spliced RAGEv1 inhibits tumorigenesis through suppression of JNK signaling. *Cancer research* 70, 5628–5638 (2010).
345. Loria, A.S., Pollock, D.M. & Pollock, J.S. Early life stress sensitizes rats to angiotensin II-induced hypertension and vascular inflammation in adult life. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 55, 494–499 (2010).
346. Renna, N. *et al.* Effect of nebivolol on cardiovascular changes associated with a rat model of insulin-resistance. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 51, 531–537 (2005).
347. Lambertsen, K.L., Biber, K. & Finsen, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 1677–1698 (2012).
348. Rubio, C. *et al.* El zinc. Oligoelemento esencial. *Nutricion hospitalaria* 22, 101–107 (2007).
349. Alexander, B.T., Hendon, A.E., Ferril, G. & Dwyer, T.M. Renal denervation abolishes hypertension in low-birth-weight offspring from pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 45, 754–758 (2005).
350. Tiu, A.C., Bishop, M.D., Asico, L.D., Jose, P.A. & van Villar, A.M. Primary Pediatric Hypertension. Current Understanding and Emerging Concepts. *Current hypertension reports* 19, 70 (2017).
351. Frederickson, C.J., Koh, J.-Y. & Bush, A.I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature reviews. Neuroscience* 6, 449–462 (2005).
352. Lee, J.H. *et al.* Intracellular ATP in balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in adipose tissue with and without tissue expansion. *International journal of obesity (2005)* 41, 645–651 (2017).
353. Williams, R.B. & Chesters, J.K. The effects of early zinc deficiency on DNA and protein synthesis in the rat. *The British journal of nutrition* 24, 1053–1059 (1970).
354. Paski, S.C. & Xu, Z. Growth factor stimulated cell proliferation is accompanied by an elevated labile intracellular pool of zinc in 3T3 cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 80, 790–795 (2002).
355. Wang, H. *et al.* Maternal zinc deficiency during pregnancy elevates the risks of fetal growth restriction. A population-based birth cohort study. *Scientific reports* 5, 11262 (2015).
356. Dötsch, J., Plank, C., Amann, K. & Ingelfinger, J. The implications of fetal programming of glomerular number and renal function. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87, 841–848 (2009).
357. Sharma, D., Shastri, S. & Sharma, P. Intrauterine Growth Restriction. Antenatal and Postnatal Aspects. *Clinical medicine insights. Pediatrics* 10, 67–83 (2016).
358. Schreuder, M.F., van Wijk, J.A.E. & Delemarre-van Waal, H.A. de. Intrauterine growth restriction increases blood pressure and central pulse pressure measured with telemetry in aging rats. *Journal of hypertension* 24, 1337–1343 (2006).

359. Eron, S.J., MacPherson, D.J., Dagbay, K.B. & Hardy, J.A. Multiple mechanisms of zinc-mediated inhibition for the apoptotic caspases -3, -6, -7, & -8. *ACS chemical biology* (2018).
360. Truong-Tran, A.Q., Carter, J., Ruffin, R.E. & Zalewski, P.D. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 14, 315–330 (2001).
361. Truong-Tran, A.Q., Ho, L.H., Chai, F. & Zalewski, P.D. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *The Journal of nutrition* 130, 1459S–66S (2000).
362. François, H. & Chatziantoniou, C. Renal fibrosis. Recent translational aspects. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* (2017).
363. Yosypiv, I.V., Schroeder, M. & El-Dahr, S.S. Angiotensin II type 1 receptor-EGF receptor cross-talk regulates ureteric bud branching morphogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17, 1005–1014 (2006).
364. Bihl, J.C. *et al.* Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke. Role of the NFκB inflammatory pathway. *Vascular pharmacology* 73, 115–123 (2015).
365. Nigam, S.K. Determinants of branching tubulogenesis. *Current opinion in nephrology and hypertension* 4, 209–214 (1995).
366. Battista, M.-C., Oligny, L.L., St-Louis, J. & Brochu, M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E124-31 (2002).
367. Dagan, A., Gattineni, J., Habib, S. & Baum, M. Effect of prenatal dexamethasone on postnatal serum and urinary angiotensin II levels. *American journal of hypertension* 23, 420–424 (2010).
368. Faensen, A.L. *et al.* Genetic low nephron number hypertension is associated with altered expression of key components of the renin-angiotensin system during nephrogenesis. *Journal of perinatal medicine* 44, 705–709 (2016).
369. Cooke, C.L., Zhao, L., Gysler, S., Arany, E. & Regnault, T.R.H. Sex-specific effects of low protein diet on in utero programming of renal G-protein coupled receptors. *Journal of developmental origins of health and disease* 5, 36–44 (2014).
370. Mao, C. *et al.* High-salt diets during pregnancy affected fetal and offspring renal renin-angiotensin system. *The Journal of endocrinology* 218, 61–73 (2013).
371. Sherman, R.C. & Langley-Evans, S.C. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clinical science (London, England : 1979)* 98, 269–275 (2000).
372. Manning, J. & Vehaskari, V.M. Postnatal modulation of prenatally programmed hypertension by dietary Na and ACE inhibition. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288, R80-4 (2005).
373. Hsu, C.-N., Lee, C.-T., Huang, L.-T. & Tain, Y.-L. Aliskiren in early postnatal life prevents hypertension and reduces asymmetric dimethylarginine in offspring



- exposed to maternal caloric restriction. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 16, 506–513 (2015).
374. Hsu, C.-N. *et al.* Aliskiren Administration during Early Postnatal Life Sex-Specifically Alleviates Hypertension Programmed by Maternal High Fructose Consumption. *Frontiers in physiology* 7, 299 (2016).
375. Suzue, M., Urushihara, M., Nakagawa, R., Saijo, T. & Kagami, S. Urinary angiotensinogen level is increased in preterm neonates. *Clinical and experimental nephrology* 19, 293–297 (2015).
376. Lopes Del Ben, G. *et al.* The urinary activity of angiotensin-converting enzyme in preterm, full-term newborns, and children. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 21, 1138–1143 (2006).
377. Husain, A. The chymase-angiotensin system in humans. *Journal of hypertension* 11, 1155–1159 (1993).
378. Danser, A.H.J. Local renin-angiotensin systems. The unanswered questions. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35, 759–768 (2003).
379. McCarthy, M.M. How it's made. Organisational effects of hormones on the developing brain. *Journal of neuroendocrinology* 22, 736–742 (2010).
380. Nuyt, A.M. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction. Evidence from human studies and experimental animal models. *Clinical science (London, England : 1979)* 114, 1–17 (2008).
381. Tubek, S. Role of zinc in regulation of arterial blood pressure and in the etiopathogenesis of arterial hypertension. *Biological trace element research* 117, 39–51 (2007).
382. Chiplonkar, S.A., Agte, V.V., Tarwadi, K.V., Paknikar, K.M. & Diwate, U.P. Micronutrient deficiencies as predisposing factors for hypertension in lacto-vegetarian Indian adults. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 239–247 (2004).
383. Tain, Y.-L., Wu, M.-S. & Lin, Y.-J. Sex differences in renal transcriptome and programmed hypertension in offspring exposed to prenatal dexamethasone. *Steroids* 115, 40–46 (2016).
384. Dodic, M., Abouantoun, T., O'Connor, A., Wintour, E.M. & Moritz, K.M. Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 40, 729–734 (2002).
385. Zhuo, J.L., Ferrao, F.M., Zheng, Y. & Li, X.C. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system. A critical review of classical and new paradigms. *Frontiers in endocrinology* 4, 166 (2013).
386. Sachse, A. & Wolf, G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 2439–2446 (2007).
387. Li, X.C. & Zhuo, J.L. Proximal tubule-dominant transfer of AT(1a) receptors induces blood pressure responses to intracellular angiotensin II in AT(1a) receptor-deficient mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 304, R588–98 (2013).

388. Brenner, B.M. & Rector, F.C. *El riñón*. 7th ed. (Elsevir, Madrid, 2005).
389. Mehta, L.S. *et al.* Acute Myocardial Infarction in Women. A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 133, 916–947 (2016).
390. Dzau, V.J., Sasamura, H. & Hein, L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes. Physiological and pharmacological implications. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 11, S13-8 (1993).
391. Rykl, J. *et al.* Renal cathepsin G and angiotensin II generation. *Journal of hypertension* 24, 1797–1807 (2006).
392. Kramkowski, K., Mogielnicki, A. & Buczek, W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 57, 529–539 (2006).
393. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G. & Nishiyama, A. The intrarenal renin-angiotensin system. From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews* 59, 251–287 (2007).
394. Bader, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems. Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 439–465 (2010).
395. Wang, C.T., Chin, S.Y. & Navar, L.G. Impairment of pressure-natriuresis and renal autoregulation in ANG II-infused hypertensive rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 279, F319-25 (2000).
396. Beutler, K.T. *et al.* Long-term regulation of ENaC expression in kidney by angiotensin II. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 41, 1143–1150 (2003).
397. Di Zhao, Seth, D.M. & Navar, L.G. Enhanced distal nephron sodium reabsorption in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 54, 120–126 (2009).
398. Rangel, L.B.A., Caruso-Neves, C., Lara, L.S. & Lopes, A.G. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na(+)-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochimica et biophysica acta* 1564, 310–316 (2002).
399. Reverte, V. *et al.* Role of angiotensin II in arterial pressure and renal hemodynamics in rats with altered renal development. Age- and sex-dependent differences. *American journal of physiology. Renal physiology* 304, F33-40 (2013).
400. Sampson, A.K., Moritz, K.M. & Denton, K.M. Postnatal ontogeny of angiotensin receptors and ACE2 in male and female rats. *Gender medicine* 9, 21–32 (2012).
401. Harrison-Bernard, L.M., Cook, A.K., Oliverio, M.I. & Coffman, T.M. Renal segmental microvascular responses to ANG II in AT1A receptor null mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 284, F538-45 (2003).
402. Hinojosa-Laborde, C. *et al.* Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 44, 405–409 (2004).

403. Te Riet, L., van Esch, J.H.M., Roks, A.J.M., van den Meiracker, A.H. & Danser, A.H.J. Hypertension. Renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation research* 116, 960–975 (2015).
404. Su, Y., Bi, J., Pulgar, V.M., Chappell, M.C. & Rose, J.C. Antenatal betamethasone attenuates the angiotensin-(1-7)-Mas receptor-nitric oxide axis in isolated proximal tubule cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 312, F1056-F1062 (2017).
405. Crislip, G.R. & Sullivan, J.C. T-cell involvement in sex differences in blood pressure control. *Clinical science (London, England : 1979)* 130, 773–783 (2016).
406. Matsusaka, T., Katori, H., Inagami, T., Fogo, A. & Ichikawa, I. Communication between myocytes and fibroblasts in cardiac remodeling in angiotensin chimeric mice. *The Journal of clinical investigation* 103, 1451–1458 (1999).
407. Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F.W., Thibault, G. & Nemer, M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 931–936 (2000).
408. Whaley-Connell, A. *et al.* Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293, E355-63 (2007).
409. Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. & Schulin, R. Zinc and its importance for human health. An integrative review. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 18, 144–157 (2013).
410. Rueckschloss, U., Quinn, M.T., Holtz, J. & Morawietz, H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells. Protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 1845–1851 (2002).
411. Garrido, A.M. & Griendling, K.K. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 302, 148–158 (2009).
412. Paravicini, T.M. & Touyz, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care* 31 Suppl 2, S170-80 (2008).
413. Muller, G. & Morawietz, H. NAD(P)H oxidase and endothelial dysfunction. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 41, 152–158 (2009).
414. Tuncay, E. *et al.* Intracellular free zinc during cardiac excitation-contraction cycle. Calcium and redox dependencies. *Cardiovascular research* 89, 634–642 (2011).
415. Lee, S.R. *et al.* The Critical Roles of Zinc. Beyond Impact on Myocardial Signaling. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19, 389–399 (2015).

416. Wang, X. *et al.* Prenatal lipopolysaccharide exposure causes mesenteric vascular dysfunction through the nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate pathway in offspring. *Free radical biology & medicine* 86, 322–330 (2015).
417. Jakoubek, V., Bíbová, J., Herget, J. & Hampl, V. Chronic hypoxia increases fetoplacental vascular resistance and vasoconstrictor reactivity in the rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294, H1638-44 (2008).
418. Crews, J.K., Murphy, J.G. & Khalil, R.A. Gender differences in Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of vasoconstriction in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 34, 931–936 (1999).
419. Sun, Y. *et al.* A Novel Regulatory Mechanism of Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin Expression by NRG-1/circACTA2/miR-548f-5p Axis. *Circulation research* 121, 628–635 (2017).
420. Tanaka, Y. *et al.* The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS letters* 579, 1579–1586 (2005).
421. Savoia, C., Burger, D., Nishigaki, N., Montezano, A. & Touyz, R.M. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e11 (2011).
422. Reckelhoff, J.F. *et al.* Subpressor Doses of Angiotensin II Increase Plasma F2-Isoprostanes in Rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 35, 476–479 (2000).
423. Govender, M.M. & Nadar, A. A subpressor dose of angiotensin II elevates blood pressure in a normotensive rat model by oxidative stress. *Physiological research* 64, 153–159 (2015).
424. Wang, F. *et al.* Renal medullary (pro)renin receptor contributes to angiotensin II-induced hypertension in rats via activation of the local renin-angiotensin system. *BMC medicine* 13, 278 (2015).
425. Yu, Y. *et al.* Activation of central PPAR- $\gamma$  attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 66, 403–411 (2015).
426. Hu, J.-J. *et al.* Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension. A quantitative immunohistochemical examination. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 56, 359–370 (2008).
427. Schiffrin, E.L. Mechanisms of remodelling of small arteries, antihypertensive therapy and the immune system in hypertension. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* 38, E394-402 (2015).
428. Conchon, S., Peltier, N., Corvol, P. & Clauser, E. A noninternalized nondesensitized truncated AT1A receptor transduces an amplified ANG II signal. *The American journal of physiology* 274, E336-45 (1998).
429. Qian, H., Pipolo, L. & Thomas, W.G. Identification of protein kinase C phosphorylation sites in the angiotensin II (AT1A) receptor. *The Biochemical journal* 343 Pt 3, 637–644 (1999).
430. Kim, J. *et al.* Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 1442–1447 (2005).
431. Ferguson, S.S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis. The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* 53, 1–24 (2001).
432. Thomsen, A.R.B. *et al.* GPCR-G Protein- $\beta$ -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* 166, 907–919 (2016).
433. Barker, D.J. The fetal origins of diseases of old age. *European journal of clinical nutrition* 46 Suppl 3, S3-9 (1992).
434. Bertagnolli, M. *et al.* Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the renin-angiotensin system. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 63, 143–150 (2014).
435. Marshall, A.C. *et al.* Antenatal betamethasone exposure is associated with lower ANG-(1-7) and increased ACE in the CSF of adult sheep. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 305, R679-88 (2013).
436. McMullen, S. *et al.* A common cause for a common phenotype. The gatekeeper hypothesis in fetal programming. *Medical hypotheses* 78, 88–94 (2012).
437. Bălan, H. & Popescu, L. "Gender specific medicine". A focus on gender-differences in hypertension. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne* 52, 129–141 (2014).