

Niveles de Angiotensina (1-7) en ratas con distinto Genotipo de Enzima Convertidora de Angiotensina I y Efecto de la Hipertensión Renovascular

Cristián Palomera^{1,2}, María Paz Ocaranza¹, Maritza Román^{1,2}, Mario Chong², Sergio Lavandero², Jorge E. Jalil¹

Departamento de Enfermedades Cardiovasculares, Escuela de Medicina, P. Universidad Católica de Chile¹ y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile², Santiago, Chile

La mayor actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) determina mayores niveles de angiotensina (Ang) II y menores de Ang-(1-7). Hemos observado mayores niveles de Ang II en ratas normotensas con mayor actividad de ECA y simultáneamente mayor hipertensión al inducir hipertensión renovascular. Planteamos que en esta situación los niveles de Ang (1-7) podrían modificarse por la HTA y además ser inversamente proporcionales a la actividad de ECA y a los niveles de Ang II. Métodos: se determinó angiotensina II y (1-7) plasmáticas en ratas normotensas e hipertensas renovasculares (modelo Goldblatt 2 riñones, 1 clip) en cepas F2 homocigotas Brown Norway (BN, con ECA elevada) o Lewis (con ECA baja). Resultados: Promedio (ES). Los niveles de hipertensión arterial e HVI fueron similares en ambas cepas en los grupos Goldblatt. Los niveles plasmáticos de Ang II fueron 509 (37) U/ml en ratas BN normotensas y 173(25) U/mL en ratas Lewis normotensas ($p < 0,05$). Los niveles plasmáticos de Ang (1-7) fueron 4 veces mayores en ratas Lewis normotensas que en las normotensas BN ($p < 0,05$) y se elevaron significativamente con la hipertensión ($p < 0,05$). Conclusión: Estos resultados podrían explicar la diferencia en la magnitud de la HTA observada previamente entre ambos genotipos de ECA y la mayor tendencia a presentar hipertensión arterial en hombres que presentan el alelo D del polimorfismo ECA I/D. Fondecyt 1000576.

Levels of Angiotensin (1-7) in Rats with Different Ace Genotypes and Effect of Renovascular Hypertension

Higher ACE activity determines higher levels of angiotensin (Ang) II and lower levels of angiotensin (1-7). We observed previously higher levels of Ang II in normotensive rats with higher ACE activity and simultaneously more hypertension in the experimental renovascular model. We hypothesize here that Ang (1-7) levels could be modified by hypertension and be also inversely proportional to ACE activity and to Ang II levels. Methods: Both plasma Ang II and Ang (1-7) levels were determined in normotensive and in renovascular hypertensive rats (Goldblatt 2 kidneys, 1 clip) in F2 homozygous Brown Norway (BN, with high ACE) and Lewis (with low ACE) rats. Results: Mean (ES). Levels of hypertension and LVH were similar in both strains in the Goldblatt groups. Plasma Ang II levels were 509 (37) U/ml in BN normotensive rats and 173 (25) U/mL in normotensive Lewis rats ($p < 0.05$). Plasma Ang (1-7) levels were 4 fold higher in normotensive Lewis rats than in the normotensive BN rats ($p < 0.05$) and increased significantly with hypertension ($p < 0.05$). Conclusion: These results could explain the differences in the magnitude of hypertension previously observed between both ACE genotypes with this experimental model and also the higher risk to develop hypertension in men with the D allele from the ACE Insertion/Deletion polymorphism. Fondecyt 1000576.

INTRODUCCIÓN

La Angiotensina (1-7) o Ang (1-7) se forma a partir de Ang I y II por efecto de las peptidasas tales como: Endopeptidasa Neutra (NEP), oligopeptidasas, proil-carboxipeptidasas y proilil-endopeptidasa¹. Una vez que la Ang (1-7) se forma, es hidrolizada rápidamente, principalmente por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA)². Por esta razón, la inhibición de la ECA debería inducir niveles elevados de Ang (1-7) y a su vez bajos niveles de Ang II³. La Ang (1-7) incrementa los efectos farmacológicos de los inhibidores de la ECA y de los bloqueadores del receptor de angiotensina II tipo 1¹.

La primera evidencia de una interacción entre Ang (1-7) con Ang II fue realizada por Bovy et al⁴, describiendo que los niveles vasculares de Sar-Ang (1-7), un análogo de Ang (1-7), inhibían el efecto contráctil de Ang II en aortas de conejos. Otros estudios confirmaron el efecto antagónico de Ang (1-7) sobre los efectos vasculares de Ang II⁵⁻⁷. Se han efectuado observaciones recientes sobre los efectos antagónicos de Ang (1-7) y Ang II en vasos sanguíneos humanos⁷.

Algunas evidencias apuntan directamente a una interacción entre Ang (1-7) y el receptor AT₁^{5,6}. En algunas circunstancias, niveles elevados de Ang (1-7) podrían producir efectos similares a la Ang II^{8,9}. Estas acciones pueden ser explicadas por la baja afinidad de la Ang (1-7) al receptor AT₁¹⁰. Recientemente se ha propuesto que en las células mesangiales Ang (1-7) puede unirse específicamente a un receptor desconocido¹¹ e interferir con la entrada de calcio a las células de la musculatura lisa.

Los efectos de Ang (1-7) son opuestos a los de Ang II porque la Ang (1-7) aumenta la síntesis de prostaglandinas, potencia el efecto de bradiquinina, produce óxido nítrico y estimula la liberación de vasopresina^{1,12}.

Por otro lado, el polimorfismo Inserción/Delección (I/D) del gen de la ECA en humanos se relaciona con los niveles de ECA en plasma¹³ y tejidos, probablemente por modulación de la transcripción del gen. Este polimorfismo se caracteriza por la presencia (Inserción, I) o ausencia (Delección, D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intron 16 de este gen¹⁴. La presencia del alelo D se asocia con niveles elevados de ECA y viceversa¹⁵⁻¹⁷.

En ratas existe un polimorfismo similar al de la ECA en humanos descrito en el locus BP/SP-1 del cromosoma 10. Este cromosoma está relacionado con la regulación de la presión arterial^{18,19}. En el poli-

morfismo de la ECA en ratas existe una diferencia de solo 4 pares de bases lo que determina diferentes niveles de ECA a nivel plasmático y tisular^{20,21}.

La presencia del alelo D en humanos determina un mayor riesgo de desarrollar hipertensión arterial solamente en hombres²²⁻²⁵. Esta observación clínico-epidemiológica tiene un correlato experimental reciente: en ratas macho, con un polimorfismo similar al de la ECA en humanos, hemos observado que los niveles elevados de ECA determinan mayores niveles de Ang II y mayores niveles de hipertensión arterial en el modelo Goldblatt²¹. En las ratas Lewis (con actividad de ECA baja) y Brown Norway (con actividad de ECA alta), este polimorfismo determina los niveles circulantes de Ang II²¹ y además los niveles plasmáticos y tisulares de NEP²⁶.

No existen, sin embargo estudios que relacionen este polimorfismo de la ECA con los niveles de Ang (1-7). Se plantea entonces como hipótesis, que el polimorfismo del gen de la ECA en ratas, determina los niveles circulantes de Ang (1-7) (tal como se ha observado previamente para la ECA y NEP^{21,26}) y que estos niveles circulantes de Ang (1-7) están inversamente relacionados con los niveles plasmáticos de Ang II. En el presente estudio hemos evaluado además el efecto de la HTA renovascular sobre los niveles de Ang (1-7) en relación al polimorfismo del gen de la ECA.

MÉTODOS

Los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales en el laboratorio (publicación NIH N° 85-23, revisión 1985).

Animales. Se utilizaron ratas macho homocigotas F₀ y F₂. Las ratas homocigotas F₂ se obtuvieron después de cruzar machos F₀ Brown Norway (BN) con hembras F₀ Lewis (LL), de procedencia del vivero Charles Rivers (Willmington, MA, USA). Las ratas F₀ produjeron heterocigotas F₁ que fueron cruzadas nuevamente para obtener la progenie F₂, con distribución mendeliana para el polimorfismo en estudio.

La hipertensión fue inducida usando el modelo Goldblatt (Gb) (2 riñones, 1 clip de 0,2 mm) como se describe previamente^{21,27} en ratas homocigotas F₂. Como control, se utilizaron ratas homocigotas F₂ que fueron operadas pero sin colocarse el clip (Sham). Todos los animales recibieron alimento para ratas y agua *ad libitum*. La presión arterial sistólica (PAS) se

midió con un pletismógrafo en la cola de los animales (*tail cuff*).

Determinación del polimorfismo de la ECA. Los partidores para la reacción de polimerasa en cadena que se utilizaron fueron: un partidor oligo sentido: 5' ATT ACC ATA GAG GGC AGC AAG ATC 3' y un partidor antisentido : 5' CAG ACT TTT CAC CAA TTT TGA CAGC 3'. El procedimiento usado para amplificar el microsatélite ubicado en la región 5' terminal del intron 13 dentro del gen de la ECA y caracterizado por (CA)_n repetidas se efectuó como se describe por Hilbert¹⁹ y Challah²⁸. El ADN se extrajo de los leucocitos circulantes usando Chelex 100^{21,26}.

Medición de actividad de la ECA. La actividad plasmática de la ECA fue medida por fluorimetría usando Z-fenil-L-histidil-L-leucina (Bachem Bioscience Inc, USA) como sustrato^{15,29-31} y fue expresada en U/mL (1U= 1 nmol L-histidil-L-leucina formada/min)^{21,26}.

Extracción y cuantificación de Ang II y Ang 1-7 circulantes

Obtención de muestra plasmática. Se obtuvieron 2 mL de sangre por decapitación de los animales que se recolectaron rápidamente en tubos que contenían 100 µL de una mezcla de inhibidores (1,5 mM de 1,10 fenantrolina monohidratada y 6,25 mM de EDTA disódico y 120 µM de pepstatina A) tal como lo describe Danser et al³². El plasma obtenido por centrifugación a 3.000 g por 10 min a 4°C se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción de angiotensinas. Los plasmas obtenidos se aplicaron en cartridges SepPack C₁₈ previamente activados con 4 mL de metanol y equilibrados con 10 mL de agua destilada fría, usando un Vacuum Manifold y conectados a una jeringa plástica. Se lavó con 1 mL de hexano (las muestras de tejido) y se eluyeron las angiotensinas con 2 mL de metanol 90%. Finalmente los extractos se evaporaron a sequedad en un concentrador Speed Vac y se almacenaron a -80°C hasta la separación por HPLC.

Separación cromatográfica por HPLC

El extracto tisular se disolvió en 200 µl de fase móvil A (25% metanol, 0,085% H₃PO₄) que contenía como estándares internos 5.000 cpm de [¹²⁵I]-Ang II, [¹²⁵I]-Ang I y [¹²⁵I]-Ang (1-7) y se centrifugaron a 10.000 g por 2 min. Las Angs se separaron en una columna cromatográfica C₁₈ fase reversa µBondapak (250 X4,6 µm; 10 mm de tamaño de partícula) con precolumna fase reversa µBondapak C₁₈. Para la separación de Angs se usó como elución de trabajo: 0-5 min gradiente constante de 85% de fase móvil A y 15% de fase móvil B (75% metanol, 0,085% H₃PO₄), 5-20 min gradiente lineal 85% fase móvil A y 15% fase móvil B, 40% fase móvil A y 60% fase móvil B, 20-21 min gradiente lineal 60% fase móvil B, 100% fase móvil B, 21-22 min 100% fase móvil B, 22-25 min 15% fase móvil A, 85% fase móvil B. La temperatura de elución fue de 45°C a un flujo de 1,5 mL/min. Las fracciones se recolectaron en tubos de poliestireno que contenían 20 µL de BSA 0,1%.

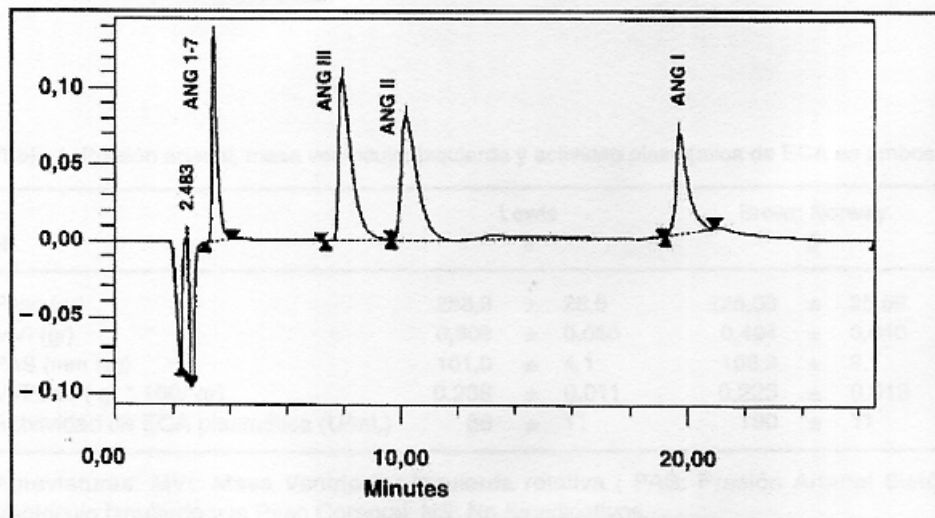


Figura 1. Separación de los diferentes estándares de angiotensinas (Ang) por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). A los 3,9 min se observa el tiempo de retención para Ang-(1-7). A los 8 minutos aparece la Ang III, a los 11 minutos se observa la Ang II y a los 20 minutos la Ang I. Una vez identificados los tiempos de retención se colectan las fracciones de las Angiotensinas y se determina su concentración mediante radioinmunoensayos independientes.

Radioinmunoensayo para Ang II y Ang 1-7

Se utilizó el procedimiento descrito por Admiral et al³³, empleando a) un anticuerpo policlonal anti Ang II donado gentilmente por el Dr. Danser, y b) un anticuerpo policlonal anti Ang 1-7 producido en nuestro laboratorio por métodos tradicionales en conejo (coeficientes de variación intraensayo e interensayo: 4,3% y 12%, respectivamente y límites de detección de Ang (1-7) entre 0,92 y 184 pg/mL), con estándares de Ang II y Ang 1-7 disponibles comercialmente y tampón de trabajo Tris base 0.1M- 0.35% BSA, pH 7.4. Los tiempos de incubación fueron 24 ó 72 horas para las determinaciones de Ang II y 1-7 respectivamente. La reacción se detuvo agregando 750 μ L y 500 μ L respectivamente de carbón activado y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. La radiactividad tanto en el sobrenadante como en la pella se determinó en un contador gamma.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como promedios \pm ES. Las comparaciones entre los 2 grupos F₀ (LL y BB) se hicieron con test de Student para muestras independientes o con el test Mann Whitney. Las comparaciones entre los 4 grupos F₂ (LL y BB) se hicieron con ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls. También se utilizó ANOVA con 2 factores (cepa e hipertensión) para evaluar el efectos de interacción. Además se utilizó regresión lineal. Se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Características generales y genotipos de la ECA

La variabilidad genética de la ECA se determinó por PCR del DNA extraído y purificado de leucocitos circulantes. Un marcador microsatelital de la ECA analizado previamente en las cepas F₀ y F₂, corroboró que la diferencia entre ratas Lewis (ratas con baja actividad de la ECA) y BN (ratas con alta actividad de ECA) fue sólo de 4 pb (168 y 171 pb respectivamente, no se muestra)^{21,26}.

No se observaron diferencias entre los genotipos Lewis y BN en animales F₀ (Tabla 1) ni en animales F₂ controles (Tabla 2) en términos de peso corporal, peso LV, peso RV o en la presión arterial sistólica.

En los dos grupos Goldblatt (sólo F₂) se observó un grado similar de hipertensión arterial (incremento de un 50% respecto de las ratas Sham, $p < 0,05$) y de hipertrofia ventricular izquierda (43% de incremento respecto de las ratas sham, $p < 0,05$) en ambos genotipos (Tabla 2).

Actividad plasmática de la ECA

La actividad plasmática de la ECA fue 2 veces mayor ($p < 0,05$) en las ratas homocigotas BN que en las ratas Lewis tanto en los grupos F₀ como en los grupos F₂ (Tablas 1 y 2). En los grupos F₂ no hubo diferencias en la actividad plasmática de la ECA entre ratas normotensas e hipertensas dentro de cada uno de los 2 genotipos (Tabla 2).

Tabla 1. Presión arterial, masa ventricular izquierda y actividad plasmática de ECA en ambos genotipos en F₀

N	Lewis 8	Brown Norway 6	P
Peso (gr)	258,9 \pm 25,5	225,33 \pm 25,59	NS
MVI (gr)	0,608 \pm 0,050	0,494 \pm 0,040	NS
PAS (mm Hg)	101,0 \pm 4,1	108,3 \pm 3,1	NS
VI/Peso (gr * 100/ gr)	0,238 \pm 0,011	0,223 \pm 0,013	NS
Actividad de ECA plasmática (U/mL)	86 \pm 11	190 \pm 11	< 0.05

Abreviaturas: MVI: Masa Ventricular Izquierda relativa ; PAS: Presión Arterial Sistólica; VIMC: razón entre Ventrículo Izquierdo y la Peso Corporal; NS: No Significativos.

Tabla 2. Presión arterial e hipertrofia ventricular izquierda en grupos F2 controles e hipertensos

N	Lewis Sham	Lewis Goldblatt	BN Sham	BN Goldblatt	ANOVA	
	38	27	36	14	F	P
Peso (gr)	189,9±6,7	184,0±6,5	202,6 ± 5,1	205,7±10,4	1,9	NS
MVI (gr)	0,476±0,017	0,648*±0,015	0,512±0,014	0,709*±0,038	29,2	<0,001
PAS (mm Hg)	104,5±2,1	166,7*±4,9	108,9±1,6	160,3*±4,5	110	<0,001
VI/Peso	0,251±0,006	0,361*±0,013	0,246±0,005	0,352*±0,020	40,5	<0,001
N	17	20	23	10		
Actividad de ECA plasmática (U/mL)	85±10	95±5	192**±10	192**±12	49,2	<0,001

Abreviaturas: BN: Brown Norway; MVI: Masa Ventricular Izquierda; PAS: Presión Arterial Sistólica; VIMC: razón entre Ventrículo Izquierdo y la Masa Corporal; NS: No Significativos. Símbolos: *: $p < 0,05$ vs su respectivo grupo sham (después de ANOVA); **: $p < 0,05$ vs ambos grupos Lewis (después de ANOVA).

Niveles plasmáticos de Ang II

En las ratas Lewis F_0 ($n=7$), los niveles plasmáticos de Ang II fueron 103 ± 21 pg/mL. En las ratas BN F_0 ($n=5$) los niveles plasmáticos de Ang II fueron 4 veces mayores que en las ratas Lewis ($p < 0,05$; Figura 2a).

En las ratas Lewis F_2 Sham ($n=13$), los niveles plasmáticos de Ang II fueron 163 ± 15 pg/mL. En las ratas BN F_2 Sham ($n=23$) los niveles plasmáticos de Ang II fueron 3 veces mayores que en las ratas Lewis ($p < 0,05$; Figura 2b). En las ratas hipertensas BN, se observaron niveles significativamente más bajos de Ang II comparados con sus controles (Figura 2b).

Globalmente en F_0 los niveles plasmáticos de Ang II se correlacionaron con la actividad plasmática de ECA ($r = 0,48$; $p < 0,01$). Al analizar esta relación por nivel de presión arterial, esta relación se observó en los grupos normotensos ($r = 0,59$, $p < 0,01$), pero no en los grupos hipertensos.

Niveles plasmáticos de Ang (1-7)

En las ratas Lewis F_0 ($n=6$), los niveles plasmáticos de Ang (1-7) fueron $4,1 \pm 0,7$ pg/mL. En las ratas BN F_0 ($n=6$) los niveles plasmáticos de Ang (1-7) fueron un 87% menores que en ratas Lewis ($p < 0,001$; Figura 3a).

En las ratas Lewis F_2 ($n=12$) los niveles plasmáticos de Ang (1-7) fueron $7,6 \pm 0,5$ pg/mL. En ratas BN ($n=19$) los niveles plasmáticos de Ang (1-7) fueron un 75% más bajos que en las ratas Lewis ($p < 0,05$; Figura 3b).

Los niveles plasmáticos de Ang (1-7) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en las ratas hipertensas (F_2) de ambos genotipos con respecto a sus controles respectivos (Figura 3b). En el análisis de varianza con 2 factores se observó un efecto significativo del genotipo ($F=22,8$; $p < 0,001$) y de la hipertensión arterial ($F=25,4$; $p < 0,001$) sobre los niveles plasmáticos de Ang (1-7) sin un efecto de interacción entre ambos factores.

Globalmente, en F_0 los niveles plasmáticos de Ang (1-7) se correlacionaron en forma inversa con la actividad plasmática de ECA ($r = -0,46$; $p < 0,01$). Al analizar esta relación por nivel de presión arterial, esta relación se observó en las ratas normotensas ($r = -0,79$; $p < 0,01$), pero no en las hipertensas.

Los niveles plasmáticos de Ang II y Ang (1-7) se correlacionaron inversamente entre sí en las ratas normotensas ($r = -0,64$; $p < 0,001$), pero no en las hipertensas (Figuras 4a y 4b).

DISCUSIÓN

Los principales hallazgos en nuestro estudio fueron:

- El polimorfismo del gen de la ECA en ratas determina los niveles circulantes de Ang (1-7), como se había observado para Ang II (MPO) y NEP (Carla).
- En condiciones basales, los niveles plasmáticos de Ang (1-7) determinados genéticamente se relacionan en forma inversa con los niveles de Ang II en la rata.

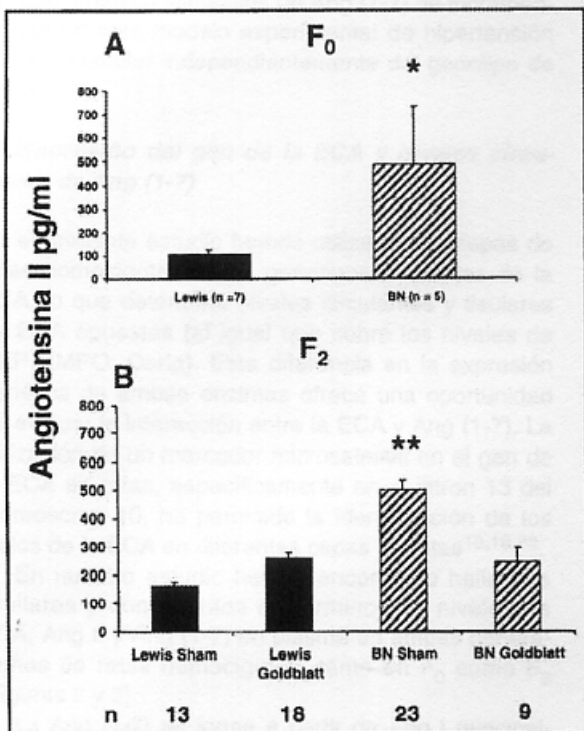


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de Ang II en ratas normotensas de la progenie F₀ (a) y en ratas normotensas (sham) e hipertensas renovasculares (Goldblatt) de la progenie F₂ (b), en ratas homocigotas con los diferentes genotipos de la ECA (Lewis en negro y Brown Norway en achurado). Las concentraciones plasmáticas de Ang II, previa separación por HPLC fueron medidas por radioinmunoensayo utilizando un anticuerpo específico contra el péptido. Símbolos: *p <0,05 vs Lewis; **p <0,05 vs los otros grupos (después de ANOVA significativo).

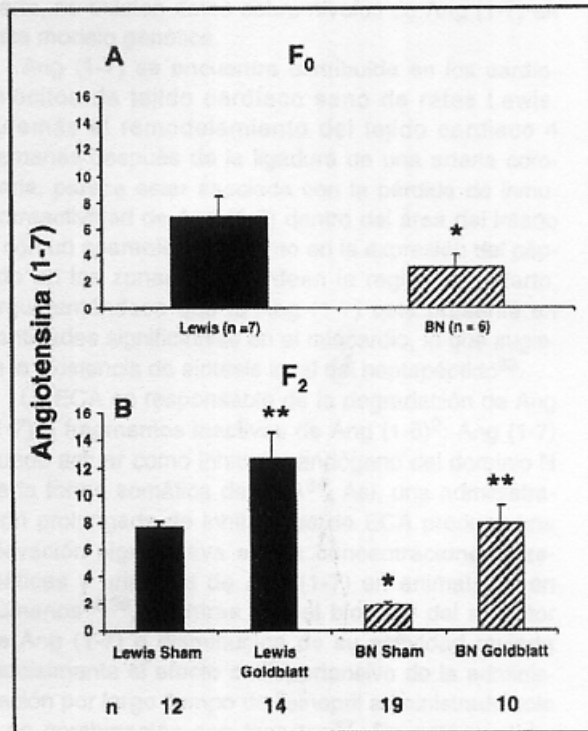


Figura 3. Concentraciones plasmáticas de Ang (1-7) en ratas normotensas de la progenie F₀ (a) y en ratas normotensas (sham) e hipertensas renovasculares (Goldblatt) de la progenie F₂ (b), en ratas homocigotas con los diferentes genotipos de la ECA (Lewis en negro y Brown Norway en achurado). Las concentraciones plasmáticas de Ang (1-7), previa separación por HPLC fueron medidas por radioinmunoensayo utilizando un anticuerpo específico contra el péptido. Símbolos: * p <0,05 vs Lewis; ** p <0,05 vs los grupos sham (después de ANOVA significativo).

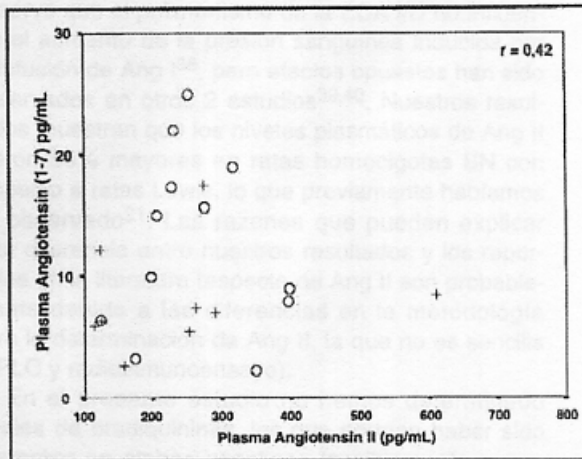
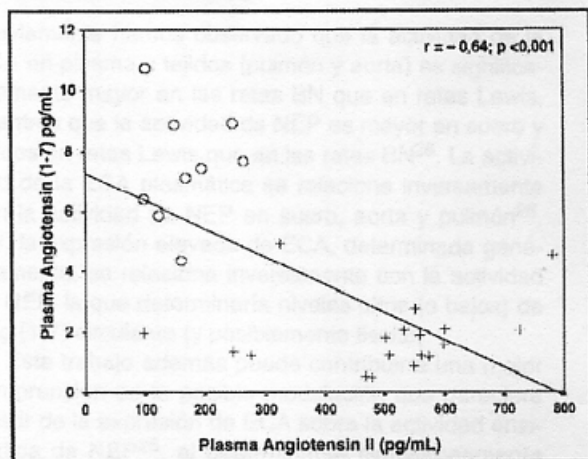


Figura 4. Relación de Ang (1-7) y Ang II plasmáticas en ratas normotensas (a) y en ratas hipertensas renovasculares (b). Los niveles plasmáticos de Ang II y Ang (1-7) se correlacionaron inversamente sólo en las ratas normotensas ($r = -0.64$; $p < 0.001$). Símbolos: o =ratas Lewis; + =ratas Brown Norway.

- c) Los niveles plasmáticos de Ang (1-7) se incrementan en este modelo experimental de hipertensión renovascular independientemente del genotipo de la ECA.

Polimorfismo del gen de la ECA y niveles circulantes de Ang (1-7)

En el presente estudio hemos utilizado dos cepas de ratas homocigotas con 2 genotipos diferentes de la ECA, lo que determina niveles circulantes y tisulares de ECA opuestos (al igual que sobre los niveles de NEP) (MPO; Carla). Esta diferencia en la expresión genética de ambas enzimas ofrece una oportunidad de evaluar la interacción entre la ECA y Ang (1-7). La utilización de un marcador microsatelital en el gen de la ECA en ratas, específicamente en el intron 13 del cromosoma 10, ha permitido la identificación de los alelos de la ECA en diferentes cepas de ratas^{18,19,28}.

En nuestro estudio hemos encontrado hallazgos similares y consistentes en términos de niveles de ECA, Ang II y Ang (1-7) en plasma en ambas generaciones de ratas homocigotas, tanto en F₀ como F₂ (Figuras 2 y 3).

La Ang (1-7) se forma a partir de Ang I principalmente. Dos endopeptidasas forman Ang (1-7), la endopeptidasa neutra 24.11 (NEP) y la metaloendopeptidasa 24.15. Estas enzimas están implicadas además en el metabolismo de otros péptidos vasodilatadores como la bradiquinina y el péptido natriurético auricular.

Relación inversa entre niveles circulantes de Ang II y Ang (1-7)

Previamente hemos observado que la actividad de la ECA en plasma y tejidos (pulmón y aorta) es significativamente mayor en las ratas BN que en ratas Lewis, mientras que la actividad de NEP es mayor en suero y tejidos en ratas Lewis que en las ratas BN²⁶. La actividad de la ECA plasmática se relaciona inversamente con la actividad de NEP en suero, aorta y pulmón²⁶. Así, la expresión elevada de ECA, determinada genéticamente, se relaciona inversamente con la actividad de NEP, la que determinaría niveles altos (o bajos) de Ang (1-7) circulante (y posiblemente tisular).

Este trabajo además puede contribuir a una mejor comprensión de la posible modulación que pareciera existir de la expresión de ECA sobre la actividad enzimática de NEP²⁶, al determinarse simultáneamente niveles de Ang II y Ang (1-7) en el modelo genético de ratas con diferente actividad de ECA. Por otra

parte, no existen datos sobre niveles de Ang (1-7) en este modelo genético.

Ang (1-7) se encuentra distribuida en los cardiomiocitos de tejido cardíaco sano de ratas Lewis. Además el remodelamiento del tejido cardíaco 4 semanas después de la ligadura de una arteria coronaria, parece estar asociada con la pérdida de inmunorreactividad de Ang (1-7) dentro del área del infarto y con un aparente incremento en la expresión del péptido en las zonas que bordean la región del infarto, argumentándose que la Ang (1-7) está presente en cantidades significativas en el miocardio, lo que sugiere la existencia de síntesis local del heptapéptido³³.

La ECA es responsable de la degradación de Ang (1-7) a fragmentos inactivos de Ang (1-5)². Ang (1-7) puede actuar como inhibidor endógeno del dominio N de la forma somática de ECA³⁴. Así, una administración prolongada de inhibidores de ECA produce una elevación significativa en las concentraciones plasmáticas y urinarias de Ang (1-7) en animales y en humanos^{35,36}, mientras que el bloqueo del receptor de Ang (1-7) o disminución de su actividad revierte parcialmente el efecto antihipertensivo de la administración por largo tiempo de lisinopril administrado solo o en combinación con losartan³⁷. En este sentido, nuestros resultados son consistentes con este razonamiento (ECA elevada debido a un polimorfismo de la ECA genera altos niveles de Ang II y bajos niveles de Ang (1-7) y viceversa).

Los niveles circulantes de Ang II deberían estar también genéticamente influenciados por el polimorfismo de la ECA. Sin embargo, esto no se ha observado previamente ni en humanos³⁸ ni en ratas²⁸. En un estudio realizado en sujetos normotensos, se observó que el polimorfismo de la ECA I/D no influencia el aumento de la presión sanguínea inducida por la infusión de Ang I³⁸, pero efectos opuestos han sido observados en otros 2 estudios^{39,40}. Nuestros resultados muestran que los niveles plasmáticos de Ang II fueron 50% mayores en ratas homocigotas BN con respecto a ratas Lewis, lo que previamente habíamos ya observado²¹. Las razones que pueden explicar esta diferencia entre nuestros resultados y los reportados en la literatura respecto de Ang II son probablemente debido a las diferencias en la metodología para la determinación de Ang II, la que no es sencilla (HPLC y radioinmunoensayo).

En el presente estudio no hemos determinado niveles de bradiquininas, los que podrían haber sido diferentes en ambos genotipos (posiblemente mayores niveles en ratas Lewis) ya que los niveles de bradiquinina son determinados por la ECA. Brown et al⁴¹

observaron una vida media más larga de bradiquininas en el suero humano con el genotipo ECA II, con niveles plasmáticos genéticamente más bajos de ECA. Sin embargo, se ha observado recientemente en humanos que el alelo D de la ECA tiene un efecto significativo sobre la degradación "in vivo" de bradiquinina y la relación de bradiquinina 1-5 en respuesta a la infusión de bradiquinina es significativamente mayor en presencia del alelo D⁴².

Mayor Ang (1-7) en la HTA renovascular

En animales, la Ang (1-7) tiene efectos fisiológicos y farmacológicos tales como vasodilatación^{43,44}, inhibición de la síntesis proteica⁴⁵ y natriuresis⁴⁶. La Ang (1-7) también conserva las funciones cardíacas y mejora la perfusión del corazón y la función del endotelio de la aorta postinfarto al miocardio experimental en la ratas⁴⁷. Se ha observado un efecto antitrófico de Ang (1-7) en un modelo de ratas con daño vascular, en el cual una infusión de durante 12 días de Ang (1-7) previno la proliferación de la neointima después de la denudación del endotelio de la arteria carótida⁴⁸.

Así, la Ang (1-7) podría contrarrestar la vasoconstricción y el crecimiento promovido por acción de Ang II y posiblemente tenga un rol cardioprotector bajo condiciones en las cuales exista una activación del sistema renina-angiotensina³³. La acción vasodilatadora de Ang (1-7) se debería a un mecanismo de señales intracelulares no del todo caracterizado que podría influenciar la secreción de prostaciclina, liberación de óxido nítrico, o amplificación del efecto vasodilatador de bradiquinina⁴⁹.

El hecho de que los niveles de Ang (1-7) son bajos en ratas BN (y posiblemente en humanos hiper-

tensos con genotipo DD para la ECA) podría explicar a) la mayor respuesta hipertensiva crónica después de la inducción de hipertensión renovascular en ratas BN como se observó previamente²¹ y b) el mayor riesgo de hipertensión observado en hombres que presentan el alelo D²²⁻²⁵.

En el mismo sentido, parecería razonable plantear que el incremento de los niveles plasmáticos de Ang (1-7) en la hipertensión renovascular podría proteger al sistema cardiovascular en esta situación. Este efecto sería independiente del genotipo de la ECA, como se ha observado. Algunas observaciones favorecen la hipótesis de que los efectos hemodinámicos de la activación neurohormonal que sigue a la restricción de sal en ratas estimula una acción tónica hipotensora producida por Ang (1-7)⁵⁰. Existen estudios experimentales preliminares evaluando el rol de este péptido en la hipertensión arterial utilizando bloqueadores de Ang (1-7)⁵¹.

En conclusión, existe una relación inversa entre Ang II y Ang (1-7) circulantes (y posiblemente también en tejidos) en ratas que está determinada por el polimorfismo del gen de la ECA. Esta relación inversa está genéticamente determinada por una mayor actividad de ECA (tanto como menor actividad de NEP) en las ratas BN y podría ser similar en humanos con el alelo D. Los niveles plasmáticos de Ang (1-7) se incrementan en la hipertensión renovascular, independientemente del genotipo de la ECA, lo que podría contribuir a balancear los efectos de la hipertensión arterial sobre el remodelado y función cardiovascular.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto FONDECYT 1000576 y por un Programa de Intercambio Conicyt-Inserm (C99S01).

REFERENCIAS

1. SANTOS R, CAMPAGNOLE-SANTOS M, ANDRADE S. Angiotensin -(1-7): an update. *Regulatory Peptides* 2000; 91: 45-62.
2. CHAPPELL M, PIRRO N, SYKES A, FERRARIO C. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 1998; 31: 362-67.
3. GALVEZ A, OCARANZA MP, LAVANDERO S, JALIL J. Early prevention of experimental left ventricular hypertrophy in hypertension and angiotensin II levels. *Rev Cardiología Española* 2001; 54: 1287-94.
4. BOVY P, TRAPANI A, MCMAHON E, PALOMO A. A carboxy-terminus truncated analogue of angiotensin II (Sar1) angiotensin II-(1-7)-amide, provides an entry to a new class of angiotensin II antagonism. *J Med Chem* 1989; 32: 520-22.
5. MAHON J, CARR R, NICOL A, HENDERSON I. Angiotensin-(1-7) is an antagonist at the type angiotensin II receptor. *J Hypertension* 1994; 12: 1377-81.
6. ROCK A, VAN-GEEL P, PINTO Y, BUIKEMA H, HENNING R, DEZEEUW D, VAN-GILST W. Angiotensin-(1-7) is a

- modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension* 1999; 34: 296-301.
7. UEDA S, MASUMORI-MAEMOTO S, ASHINO K, NAGAHARA T, GOTOH E, UMEMURA S, ISHII M. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. *Hypertension* 2000; 35: 998-1001.
 8. BENTER I, FERRARIO C, MORRIS M, DIZ D. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1995; 269: H313-H319.
 9. ABBAS A, GORELIK G, CARBINI L, SCIOLI A. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 1997; 30: 217-21.
 10. ROWE B, SAYLOR D, SPETH R, ABSHER D. Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Reg Pap* 1995; 56: 139-46.
 11. CHANSEL D, VANDERMEERSCH S, OKO A, CURAT C, ARDAILLOU R. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 2001; 414(2-3): 165-75.
 12. HEITSCH H, BROVKOVYCH S, MALINSKI T, WIENER G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension* 2001; 37: 72-6
 13. CAMBIEN F, COSTEROUSSE O, TIRET L ET AL. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90: 669-76
 14. SOUBRIER F, ALHENC-GELAS F, HUBERT C, ALLEGRINI J, JOHN M, TREGEAR G, CORVOL P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 85: 9386-90.
 15. JALIL JE, PIDDO AM, CORDOVA S, CHAMORRO G, BRAUN S, JALIL R, VEGA J, JADUE L, LAVANDERO S, LASTRA P. Prevalence of the angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism, plasma ACE activity and left ventricular mass in normotensive Chilean population. *Am J Hypertension* 1999; 12: 697-704.
 16. RIGAT B, HUBERT C, AHLENC-GELAS F, CAMBIEN F, CORVOL P, SOUBRIER F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-46.
 17. TIRET L, RIGAT B, VISVIKIS S, BREDI C, CORVOL P, CAMBIEN F, SOUBRIER F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205.
 18. JACOB HJ, LINDPAINTNER K, LINCOLN SE, KASUMI K, BUNKER R, MAO YP, GANTEN D, DZAU VJ, LANDER ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67: 213-24.
 19. HILBERT P, LINDPAINTNER K, BECKMANN J, SERIKAWA T, SOUBRIER F, DUBAY C, CARTWRIGHT P, DE GOUYON B, JULIER C, TAKAHASHI S, VINCENT M, GANTEN D, GEORGES M, LATHROP GM. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991; 353: 521-29.
 20. KREUTZ R, HUBNER N, GANTEN MD, LINDPAINTER MD. Genetic linkage of the ACE gene to plasma angiotensin-converting enzyme activity but not to blood pressure. *Circulation* 1995; 92: 2381-84.
 21. OCARANZA MP, PIDDO AM, FAÜNDEZ P, LAVANDERO S, JALIL J. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism influences chronic hypertensive response in the rat Goldblatt model. *Journal of Hypertension* 2002; 20: 413-20.
 22. O'DONELL C, LINDPAINTNER K, LARSON M, RAO V, ORDOVAS J, SCHAEFER E, MYERS R, LEVY D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97: 1766-72.
 23. HIGAKI J, BABA S, KATSUKA T. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men. The Suita study. *Circulation* 2000; 101: 2060-65.
 24. DANSER AHJ, SCHUNKERT H. Renin-angiotensin system gene polymorphisms: potential mechanisms for their association with cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 2000; 410: 303-16
 25. CELENTANO A, PALMIERI V, MANCINI F, CRIVARO M, OLIVIERO M, FERRARA L, DE STEFANO V, DI MINNO G, DE SIMONE G. Ambulatory blood pressure is associated to ACE polymorphism in sustained hypertension in absence of cardiovascular risk factors. *J Am Coll Cardiol* 1997; 84A (abstract).
 26. OLIVERI C, OCARANZA M, CAMPOS X, LAVANDERO S, JALIL J. Angiotensin I-converting enzyme modulates neutral endopeptidase activity in the rat. *Hypertension* 2001; 38: 650-54.
 27. DUSSAILLANT G, GONZÁLEZ H, CÉSPEDES C, JALIL JE. Regression of left ventricular hypertrophy in experimental renovascular hypertension: diastolic dysfunction depends more on myocardial damage than mass. *J Hypertension* 1996; 14: 1117-23.
 28. CHALLAH M, VILLARD E, PHILIPPE M, RIBADEAU-DUMAS A, GIRAudeau B, JANIAK P, VILAIN JP, SOUBRIER F, MICHEL JB. Angiotensin I-converting enzyme genotypes influence arterial response to injury in normotensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 235-43.

29. FRIEDLAND J, SILVERSTEIN E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 1976;66: 416-24.
30. PIQUILLOU Y, REINHARZ A, ROTH M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim Biophys Acta* 1970; 206: 136-42.
31. JALIL JE, OCARANZA MP, PIDDO AM, JALIL R. Reproducibility of plasma angiotensin-converting enzyme activity in human subjects determined by fluorimetry with Z-phenylalanine-histidyl-leucine as substrate. *J Lab Clin Med* 1999; 133: 501-06.
32. DANSER A, VAN KATS JP, ADMIRAL P, DERKX F, LAMERS J, VERDOUW P, SAXENA P, SCHALEKAMP M. Cardiac renin and angiotensins: uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 1994; 24: 37-48.
33. ADMIRAL P, DERKX F, DANSER A, PIETERMAN H, SCHALEKAMP M. Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension. *Hypertension* 1990; 15: 44-55.
33. FERRARIO CM. Does Angiotensin-(1-7) Contribute to Cardiac Adaptation and Preservation of Endothelial Function in Heart Failure? *Circulation* 2002; 105: 1523-25.
34. DEDDISH PA, MARCIC B, JACKMAN HL, ET AL. N-domain specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 1998; 31: 912-17.
35. CHAPPELL MC, FERRARIO CM. Angiotensin-(1-7) in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 88: 231-35.
36. LUQUE M, MARTIN P, MARTELL N, ET AL. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens* 1996; 14: 799-805.
37. IYER SN, CHAPPELL MC, AVERILL DB, ET AL. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension* 1998; 31: 699-705.
38. LACHURIE ML, AZIZI M, GUYENE TT, ALHENC-GELES F, MÉNARD J. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism has no influence on the circulating renin-angiotensin-aldosterone system or on blood pressure in normotensives. *Circulation* 1995; 345: 2933-42.
39. UEDA S, ELLIOTT HL, MORTON JJ, CONNELL JMC. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1995; 25: 1266-69.
40. VAN DIJK MA, KROON I, KAMPER AM, BOOMSMA F, DANSER AH, CHANG PC. The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 484-90.
41. BROWN NJ, BLAIS CJR, GANDHI SK. ACE insertion/deletion genotype affects bradykinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 373-77.
42. MURPHEY LJ, GAINER JV, VAUGHAN DE, BROWN NJ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human *in vivo* metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000; 102: 829-32.
43. BROSNIHAN KB, LI P, TALLANT EA, ET AL. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol Res* 1998; 31: 227-34.
44. LI P, CHAPPELL MC, FERRARIO CM, ET AL. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension* 1997; 29: 394-400 [Abstract].
45. FREEMAN EJ, CHISOLM GM, FERRARIO CM ET AL. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1996; 28: 104-08.
46. HANDA RK, FERRARIO CM, STRANDHOY JW. Renal actions of angiotensin-(1-7) *in vivo* and *in vitro* studies. *Am J Physiol* 1996; 270(1 Pt 2): F141-F147.
47. LOOT A, ROKS AJM, HENNING RH, ET AL. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation* 2002; 105: 1548-50.
48. STRAWN WB, FERRARIO CM, TALLANT EA. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2): 207-11.
49. FERRARIO CM, IYER SN. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept* 1998; 78: 13-8.
50. IYER SN, AVERILL DB, CHAPPELL MC, YAMADA K, ALFRED AJ, FERRARIO CM. Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted rats. *Hypertension* 2000; 36: 417-22.
51. BAYORTH MA, EATMAN D, WALTON M, SOCCI RR, THIERRY-PALMER M, EMMETT N. 1A-779 attenuates angiotensin-(1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats. *Peptides* 2002; 23: 57-64.