

## Tesis Doctoral

# Implicancias de los receptores de las endotelinas sobre la regulación central de la tirosina hidroxilasa y sus consecuencias sobre la presión arterial en ratas hipertensas DOCA-sal

Cassinotti, Luis Roberto

2018-04-06

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Cassinotti, Luis Roberto. (2018-04-06). Implicancias de los receptores de las endotelinas sobre la regulación central de la tirosina hidroxilasa y sus consecuencias sobre la presión arterial en ratas hipertensas DOCA-sal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Cassinotti, Luis Roberto. "Implicancias de los receptores de las endotelinas sobre la regulación central de la tirosina hidroxilasa y sus consecuencias sobre la presión arterial en ratas hipertensas DOCA-sal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-04-06.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Implicancias de los receptores de las endotelinas sobre la  
regulación central de la tirosina hidroxilasa y sus consecuencias  
sobre la presión arterial en ratas hipertensas DOCA-sal.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Biológica

**Lic. Cassinotti Luis Roberto**

**Director de tesis:** Dr. Marcelo Sergio Vatta.

**Consejeros de estudio:** Dr. Omar Pedro Pignataro.

**Lugar trabajo:** Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires e Instituto de la Química y el Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA, UBA-CONICET).

**Buenos Aires, 2018**

## **IMPLICANCIAS DE LOS RECEPTORES DE LAS ENDOTELINAS SOBRE LA REGULACION CENTRAL DE LA TIROSINA HIDROXILASA Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL.**

**Resumen.** El sistema nervioso central (SNC) tiene un papel preponderante en la regulación a corto plazo de la presión arterial. Sin embargo, diferentes estudios muestran que el mismo participa también en la modulación a largo plazo. Las endotelinas y sus receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) se expresan en diversas áreas del SNC, muchas de ellas involucradas en la regulación de la función cardiovascular. Nuestras investigaciones buscan entender la interacción entre el sistema endotelinérgico central y la transmisión catecolaminérgica, y su posible participación en la modulación de la función cardiovascular tanto en situaciones normales como patológicas. En el presente trabajo estudiamos los efectos de la inhibición central crónica (7 días) de los receptores ET<sub>A</sub> o de la activación de los receptores ET<sub>B</sub> sobre el funcionamiento del sistema catecolaminérgico en un modelo de hipertensión arterial (HTA) sal dependiente como es el DOCA-sal. Para esto se evaluó el sistema catecolaminérgico mediante la determinación de diferentes parámetros de la tirosina hidroxilasa (TH) en el hipotálamo anterior (HA), el hipotálamo posterior (HP) y en el bulbo olfatorio (BO). Al respecto, se estudiaron los niveles de actividad de la enzima, así como también los niveles de expresión, fosforilación y su ARNm. Por un lado, el HA y el HP son núcleos importantes en la regulación central del sistema cardiovascular. Por otro lado, el BO se comunica con diversas áreas relacionadas con la modulación de la actividad cardiovascular, sin embargo, poco se conoce sobre su participación en este sentido. En paralelo, se evaluaron las consecuencias a largo plazo de la inhibición ET<sub>A</sub> o de la activación ET<sub>B</sub> sobre parámetros hemodinámicos como la presión arterial sistólica (PAS) y la frecuencia cardíaca (FC). La inhibición ET<sub>A</sub> moduló de manera diferencial los distintos factores analizados de la TH, principalmente en el HA, el HP y el BO derecho los animales DOCA-sal. Además, debido al tratamiento, la PAS disminuyó significativamente en estos animales hipertensos. Se observaron resultados similares sobre este parámetro hemodinámico al activar crónicamente el receptor ET<sub>B</sub>. Concluimos que los receptores de las endotelinas juegan un papel clave en la modulación crónica del sistema catecolaminérgico central y en el desarrollo de la HTA sal dependiente en este modelo animal abriendo un nuevo campo de discusión y experimentación sobre los posibles beneficios terapéuticos de encontrar nuevos antagonistas ET<sub>A</sub> o agonistas ET<sub>B</sub> con mayor acción específica sobre el SNC.

**PALABRAS CLAVE:** ENDOTELINAS; HIPERTENSIÓN; DOCA-sal; TIROSINA HIDROXILASA; HIPOTÁLAMO; BULBO OLFATORIO.

# **IMPLICATIONS OF THE ENDOTHELIN RECEPTORS ON CENTRAL REGULATION OF THE TYROSINE HYDROXYLASE AND ITS CONSEQUENCES ON BLOOD PRESSURE IN DOCA-SALT HYPERTENSIVE RATS.**

**Abstract.** Central nervous system (CNS) has a relevant role on short-term regulation of blood pressure. However, new findings remark his long-term participation. Endothelins and its receptors (ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>) are expressed in various areas at the CNS, many of them involved on cardiovascular function regulation. Our researches aim to understand the interaction between central endothelinergic system and catecholaminergic transmission. In the present work we study the effects of ET<sub>A</sub> chronic blockade or ET<sub>B</sub> chronic activation over the functioning of catecholaminergic system in the development and/or maintenance of salt dependent hypertension using the DOCA-salt animal model. We assessed the catecholaminergic system throughout the study of the tyrosine hydroxylase (TH) in both, anterior and posterior hypothalamus, both important nucleus that participates in the regulation of cardiovascular system. We also investigate the olfactory bulb. This telencephalic region communicates with diverse areas related with cardiovascular activity regulation, however, little is known about its participation in this sense. In parallel, we assessed the consequences of ET<sub>A</sub> blockade or ET<sub>B</sub> activation over systolic blood pressure and heart rate. Chronic ET<sub>A</sub> blockade modulates TH mainly at both anterior and posterior hypothalamus and at the right olfactory bulb of DOCA-salt animals. Also, a significant systolic blood pressure reduction was observed in these animals. Similar results were observed in this hemodynamic parameter when ET<sub>B</sub> was chronically activated. We conclude that endothelin receptors play a key role in chronic central catecholaminergic system modulation and in the development of salt dependent hypertension in this animal model.

**KEY WORDS:** ENDOTHELIN; HYPERTENSION; DOCA-salt; TYROSINE HYDROXYLASE; HIPOTHALAMUS; OLFACTORY BULB.

“Si quieres ir rápido camina solo  
Si quieres llegar lejos ve acompañado”

Proverbio africano

A Paula.

---

## Agradecimientos

---

*Agradezco profundamente a:*

*A la Universidad de Buenos Aires por haber sido la institución que permitió mi formación profesional y destacar su carácter de universidad pública, libre y gratuita. En particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales donde me convertí en Biólogo y la Facultad de Farmacia y Bioquímica siendo mi espacio de trabajo durante estos años de formación doctoral.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por financiar económicamente la labor realizada durante estos 5 años.*

*Al Instituto de la Química y el Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA-UBA-CONICET) y la Cátedra de Fisiología (FFyB-UBA) por darme el espacio y las herramientas para realizar el presente trabajo de Tesis.*

*Al Profesor Dr. Marcelo S. Vatta, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación. Por trabajar a la par nuestra, día a día, en las innumerables tareas que tienen que ver con llevar adelante un laboratorio. Por sus consejos, correcciones, sugerencias, enseñanzas y principalmente por haber estado presente, humana y profesionalmente, siempre.*

*Al Profesor Dr. Omar P. Pignataro, mi consejero de estudios. Por guiarme en la elección de los cursos de posgrado, por su amabilidad y su buen humor.*

*A los miembros de mi comisión de seguimiento: la Dra. Claudia Bregonzio, la Dra. Silvia García y nuevamente al Dr. Omar Pignataro. Por sus consejos, sugerencias y correcciones orientándome hacia un trabajo científico de calidad.*

*A mis compañeras de trabajo. La Dra. Julia Guil (Juli), la Bioq. Mercedes Schöller (Mechi), la Dra. Mónica Navarro (Moni) y la Dra. Sandra Hope (San). Gracias Juli, Mechi, Moni y San por aceptar un forastero, biólogo, de exactas y hombre. Tanto por las infinitas veces que me ayudaron en mis experimentos como por las charlas, anécdotas, risas, mates y comidas compartidas. Bendito fui entre todas ustedes.*

*A la Dra. Liliana Bianciotti (Lili). Por colaborar siempre con nuestro laboratorio, por asistirme en la escritura del paper y por ayudarme en la búsqueda posdoctoral.*

*A todos los que fueron pasando por el laboratorio: Vani, Tony, Ale, Flor, May, Aldi, Carla, Majó y Lu. Por la ayuda que nos dieron, a todos, en el laboratorio. Por compartir el día a día, haciendo el esfuerzo aún en medio de la cursada.*

*A Gaby Noceti por ayudarme con el trabajo de bioterio, cuidando los animales, pesándolos, controlándoles la comida y el agua para que mis experimentos salgan bien.*

*A la gente de la Cátedra de Fisiología y del INIGEM. A Nati G, Facu, Debo, Vicky, Estefa, Myr, Ani N, Anita, Fede, Mechi, Franquito, Nati O, Bernardita, Caro, Romi, Beatriz, Lucho, Juan, Gra, Ingrid, Sandra L, Alicia, Ro, Analía, Gaby MP, Andrea, Ana, Edith y Amalia. Por darme una mano siempre que lo necesité. Por las charlas, festejos, almuerzos y congresos compartidos.*

*A mis amigos del barrio (Sarandí) que creen que lo que hago es difícil y que por eso dicen que soy inteligente. A Nacho, Maira, el Tero, Martín, Rodrigo, Brenda, Cynthia, Seba, Javi y Eze. Uno nunca debe olvidar sus orígenes.*

*A mis amigos de la facultad, Los Pinos. A Gustavo, JP, Beto, Nahuel, Hugo, Ferraro, Sato, Ale y Aldi. Porque saben del esfuerzo que demanda la carrera en Exactas y algunos también entienden el del doctorado. Y aunque digan que los becarios “vivimos de sus impuestos”, lo hago feliz, porque reinvierto gran parte de sus aportes en compartir tiempo con ellos.*

*A Sandino, Dinito. Mi amigo fiel, con su mirada de amor incondicional me llena el alma.*

*A mi familia. A mis viejos Isabel y Luis que, si bien creen que soy médico, están orgullosos de que lo sea. A mis hermanos Martín, Diego y Ezequiel por compartir la vida y el amor por Arsenal. A mis sobrinos: Santi, Facu, Thiago, Avril y Martina.*

*A Pau, todo. Porque está siempre a mi lado, haciéndome reír en las buenas, abrazándome en las malas. Por entender mis momentos de estrés y enseñarme a salir de ellos con la mejor actitud. Por su energía interminable. Por su alegría. Porque la admiro tanto. Por compartir su vida conmigo y por su sonrisa. La amo, y esta tesis es para ella.*

---

# Índice

---

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción.....</b>                                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1. Hipertensión.....                                                                            | 1         |
| 1.2. Regulación de la presión arterial.....                                                       | 3         |
| 1.3. El hipotálamo. ....                                                                          | 6         |
| 1.3.1. Hipotálamo anterior. ....                                                                  | 7         |
| 1.3.2. Hipotálamo posterior. ....                                                                 | 8         |
| 1.4. Los bulbos olfatorios. ....                                                                  | 9         |
| 1.5. El modelo DOCA-sal. ....                                                                     | 12        |
| 1.6. El sistema catecolaminérgico.....                                                            | 16        |
| 1.6.1. Regulación de la tirosina hidroxilasa. ....                                                | 18        |
| 1.6.2. Efectos sobre la regulación de la presión arterial. ....                                   | 21        |
| 1.7. El sistema endotelinérgico. ....                                                             | 21        |
| 1.7.1. Las endotelinas.....                                                                       | 21        |
| 1.7.2. Los receptores de las endotelinas ....                                                     | 23        |
| 1.7.3. Endotelinas centrales, el sistema catecolaminérgico y la fisiología<br>cardiovascular..... | 25        |
| 1.8. Asimetrías funcionales.....                                                                  | 26        |
| 1.9. Antecedentes de nuestro laboratorio. ....                                                    | 28        |
| 1.9.1. Modulación del sistema catecolaminérgico por endotelinas en el<br>hipotálamo. ....         | 28        |
| 1.9.2. Modulación del sistema catecolaminérgico por endotelinas en el bulbo<br>olfatorio.....     | 30        |
| <b>2. Hipótesis y objetivos .....</b>                                                             | <b>32</b> |
| <b>3. Materiales y métodos.....</b>                                                               | <b>35</b> |
| 3.1. Animales. ....                                                                               | 35        |

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2. Desarrollo del modelo DOCA-sal.</b>                           | <b>36</b> |
| 3.2.1. Caracterización del modelo DOCA-sal.                           | 37        |
| <b>3.3. Cirugías y procedimientos experimentales.</b>                 | <b>41</b> |
| 3.3.1. Grupos experimentales.                                         | 42        |
| 3.3.2. Preparación de BQ-610, IRL1620 y las bombas osmóticas.         | 42        |
| 3.3.3. Colocación de la bomba osmótica y la cánula ICV.               | 44        |
| 3.3.4. Registros de presión arterial sistólica y frecuencia cardíaca. | 45        |
| 3.3.5. Obtención y procesamiento de las muestras.                     | 46        |
| <b>3.4. Drogas y reactivos.</b>                                       | <b>47</b> |
| <b>3.5. Actividad de la tirosina hidroxilasa.</b>                     | <b>48</b> |
| <b>3.6. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.</b> | <b>49</b> |
| <b>3.7. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.</b>            | <b>50</b> |
| <b>3.8. Análisis estadístico.</b>                                     | <b>52</b> |
| <b>4. Resultados</b>                                                  | <b>54</b> |
| <b>4.1. Bloqueo crónico del receptor ET<sub>A</sub>.</b>              | <b>54</b> |
| 4.1.1. Parámetros hemodinámicos.                                      | 54        |
| 4.1.2. Hipotálamo anterior y posterior.                               | 57        |
| 4.1.2.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.                        | 58        |
| 4.1.2.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.    | 59        |
| 4.1.2.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.               | 62        |
| 4.1.3. Bulbos olfatorios.                                             | 63        |
| 4.1.3.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.                        | 64        |
| 4.1.3.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.    | 65        |
| 4.1.3.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.               | 68        |
| 4.1.4. Resumen: Bloqueo crónico del receptor ET <sub>A</sub> .        | 69        |
| <b>4.2. Activación crónica del receptor ET<sub>B</sub>.</b>           | <b>72</b> |
| 4.2.1. Parámetros hemodinámicos.                                      | 72        |
| 4.2.2. Hipotálamo anterior y posterior.                               | 76        |
| 4.2.2.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.                        | 76        |
| 4.2.2.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.    | 78        |
| 4.2.2.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.               | 81        |

|                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.3. Bulbos olfatorios.....                                           | 83         |
| 4.2.3.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa. ....                     | 83         |
| 4.2.3.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada. .... | 84         |
| 4.2.3.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa. ....            | 87         |
| 4.2.4. Resumen: Activación crónica del receptor ET <sub>B</sub> .....   | 88         |
| <b>5. Discusión.....</b>                                                | <b>91</b>  |
| <b>5.1. El modelo DOCA-sal. ....</b>                                    | <b>92</b>  |
| 5.1.1. El sistema catecolaminérgico hipotalámico.....                   | 95         |
| 5.1.2. El sistema catecolaminérgico en el bulbo olfatorio. ....         | 96         |
| <b>5.2. Implicancias de los receptores de las endotelinas.....</b>      | <b>97</b>  |
| 5.2.1. Hipotálamo anterior y posterior.....                             | 98         |
| 5.2.2. El bulbo olfatorio. ....                                         | 104        |
| 5.2.3. Parámetros cardiovasculares.....                                 | 107        |
| <b>5.3. Discusión general.....</b>                                      | <b>110</b> |
| <b>6. Conclusiones.....</b>                                             | <b>122</b> |
| <b>7. Perspectivas.....</b>                                             | <b>124</b> |
| <b>8. Abreviaturas.....</b>                                             | <b>127</b> |
| <b>9. Bibliografía.....</b>                                             | <b>129</b> |

---

# 1. Introducción

---

## 1.1. Hipertensión.

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad multifactorial, de evolución crónica y según el último informe de la organización mundial de la salud, afecta a más de 1000 millones de personas en todo el mundo. Ya sea directa o indirectamente es la responsable de más de 10 millones de muertes por año, representando en 2008 el 18% del total [1,2]. Según este artículo, 1/3 de las personas mayores de 25 años es hipertenso, un 1/3 de los hipertensos no lo sabe y dentro de los que conocen su padecimiento, 1/3 no responde apropiadamente a los diferentes tratamientos disponibles hoy en día [1,2]. La HTA se caracteriza por cambios hemodinámicos que provocan un aumento sostenido de la presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) por encima de los 140 mmHg y los 90 mmHg respectivamente (Tabla 1) [3,4]. Debido a que no presenta síntomas durante su desarrollo, se la conoce como el “asesino silencioso”. Su carácter asintomático deriva en una alta tasa de morbilidad y mortalidad debido al daño ocasionado en órganos blanco como el corazón, el riñón, la vasculatura, la retina y el sistema nervioso central (SNC). Por ello, la HTA es considerada la causa principal de enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y falla renal [1,2].

Aproximadamente el 50% de las muertes de individuos menores de 70 años a nivel mundial se deben a patologías no transmisibles como lo es la HTA. En Argentina, esta proporción representa el 80%, siendo el 42 % de ellas por enfermedades cardiovasculares. El estudio RENATA 2 es el último trabajo realizado sobre la incidencia de la HTA sobre la población argentina [5]. Si bien fue hecho en el año 2015 sus resultados aún no fueron publicados. Por esta razón, debemos apoyarnos en el estudio RENATA inmediatamente anterior publicado en el año 2012 [6]. Esta investigación reportó que cerca del 34% de los individuos estudiados eran hipertensos, con una mayor prevalencia en pacientes hombres. Además, el 37% de los hipertensos desconocía su enfermedad. Llamativamente, el 56% de los individuos hipertensos estaban tratados pero sólo el 27% pudo controlar su presión arterial (PA) [6].

La investigación científica en el campo de esta enfermedad resulta un factor de vital importancia ya que, en la mayoría de los casos, la falta de conocimiento acerca de los

mecanismos fisiopatológicos subyacentes en la génesis, desarrollo y/o mantenimiento de la HTA la convierten en un serio problema para el sistema de salud a nivel global. Esto no repercute solamente a nivel humano, en cuanto a su calidad y expectativa de vida, sino también a nivel económico representando un gasto creciente en políticas públicas sanitarias orientadas a la prevención y el tratamiento de la HTA [1,2].

Múltiples factores llevan al desarrollo y mantenimiento de la HTA. Estos componentes son de índole genético, ambientales, anatómicos, adaptativos, asociados al sistema nervioso, humorales, endócrinos, hemodinámicos, etc. [7,8]. Esta complejidad dificulta el estudio y la comprensión de los mecanismos implicados en la génesis, desarrollo y mantenimiento de esta patología. En este contexto, se hace conveniente la clasificación según su factor de origen en esencial y secundaria. La HTA esencial es aquella cuya causa es desconocida (en general con una fuerte influencia hereditaria) y esto ocurre aproximadamente en el 90% de los casos [9,10]. Por otro lado, la HTA secundaria es aquella que muestra algún factor responsable y sucede entre el 5% y el 10% de los casos [11,12]. En esta última, el aumento de la PA puede ser un indicador de alguna enfermedad subyacente aún más grave [13]. En muchos de estos pacientes, la HTA puede ser estudiada y controlada sin la necesidad de un tratamiento crónico. Los factores más frecuentes de HTA secundaria incluyen enfermedades de origen renal y endocrinopatías como Cushing, feocromocitoma, hipertiroidismo e hiperaldosteronismo [13–15]. Algunos de los factores que contribuyen al desarrollo de HTA incluyen la obesidad, el consumo de alcohol, la edad y diferentes fuentes de estrés asociadas a la vida en sociedades desarrolladas (trabajo, depresión, ansiedad, mala alimentación, etc.) [13,16–20].

| CLASIFICACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL |                     |                      |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|
| Condición                            | PA sistólica (mmHg) | PA diastólica (mmHg) |
| Óptima                               | < 120               | < 80                 |
| Normal                               | 120-129             | 80-84                |
| PA limítrofe                         | 130-139             | 85-89                |
| <b>Hipertensión arterial</b>         |                     |                      |
| HTA nivel 1                          | 140-159             | 90-99                |
| HTA nivel 2                          | 160-179             | 100-109              |
| HTA nivel 3                          | ≥ 180               | ≥ 110                |

**Tabla 1. Clasificación de la presión arterial.** Valores considerados sin el uso de drogas antihipertensivas y sin enfermedad aguda. PA: Presión arterial, HTA: Hipertensión arterial. Modificado de “Consenso de hipertensión arterial”, Sociedad Argentina de Cardiología, 2013 [4].

El consumo de 5 gr. diarios de sal contribuye al desarrollo de HTA y de enfermedades cardiovasculares, entonces resulta alarmante que actualmente el consumo promedio a nivel mundial sea cercano a los 10 gr. [1,21–23]. En este sentido, diferentes abordajes se han puesto en práctica con el objetivo de prevenir y reducir la incidencia de la HTA. Un estudio muy importante utilizó una dieta denominada DASH (por su nombre en inglés: *Dietary Approach to Stop Hypertension*) basado en la reducción de la ingesta de carnes rojas y azúcares elevando el consumo de vegetales y frutas. Se observó que esta dieta combinada con una reducción en el consumo de sodio disminuye efectivamente la PA tanto en pacientes normotensos como en hipertensos [24,25]. Otro grupo de investigación realizó un seguimiento a largo plazo (10-15 años) de pacientes sometidos a la dieta TOHP (por su nombre en inglés: *Trials of Hypertension Prevention*). Los resultados indicaron que una dieta con bajo sodio disminuye no solo la PA sino que reduce hasta en un 30% el riesgo de morir por una enfermedad cardiovascular, padecer infarto de miocardio y/o un accidente cerebrovascular [26,27].

Esta íntima relación entre el aumento de la PA y la ingesta elevada de sodio se correlaciona con alteraciones a nivel central [14,16,28]. Un tercio de las personas normotensas son sensibles al sodio; y en ellos los mecanismos que llevan a un incremento de la PA parecen implicar modificaciones en la regulación del SNC (principalmente en la rama simpática) y en el sistema renina-angiotensina (SRA) [20,29]. Se ha demostrado que la alta ingesta de sodio y el consecuente aumento de la PA va acompañado de alteraciones a nivel noradrenérgico [30,31]. Además, los pacientes que padecen HTA también presentan una mayor actividad del SNC probablemente inducida por el exceso en el consumo de sal [32]. Si bien es plausible la interrelación entre la generación de HTA ligada al alto consumo de sodio y acompañada por una desregulación del SNC, los mecanismos por los cuales se desarrolla y mantiene el estado hipertensivo no están claramente identificados [22,23,29,33–35].

## **1.2. Regulación de la presión arterial.**

La PA se define como la presión que ejerce la sangre sobre las paredes de las arterias y se mide normalmente en milímetros de mercurio (mmHg). Este parámetro puede subdividirse en dos componentes principales: la PA diastólica (PAD), que es el valor mínimo de presión que se observa durante la diástole, y la PA sistólica (PAS), que es el valor máximo de presión alcanzado durante la sístole cardíaca. Los valores de PA considerados “normales” rondan los 80 mmHg para la PAD y 120 mmHg para la PAS (Tabla 1) [4]. La PAD está

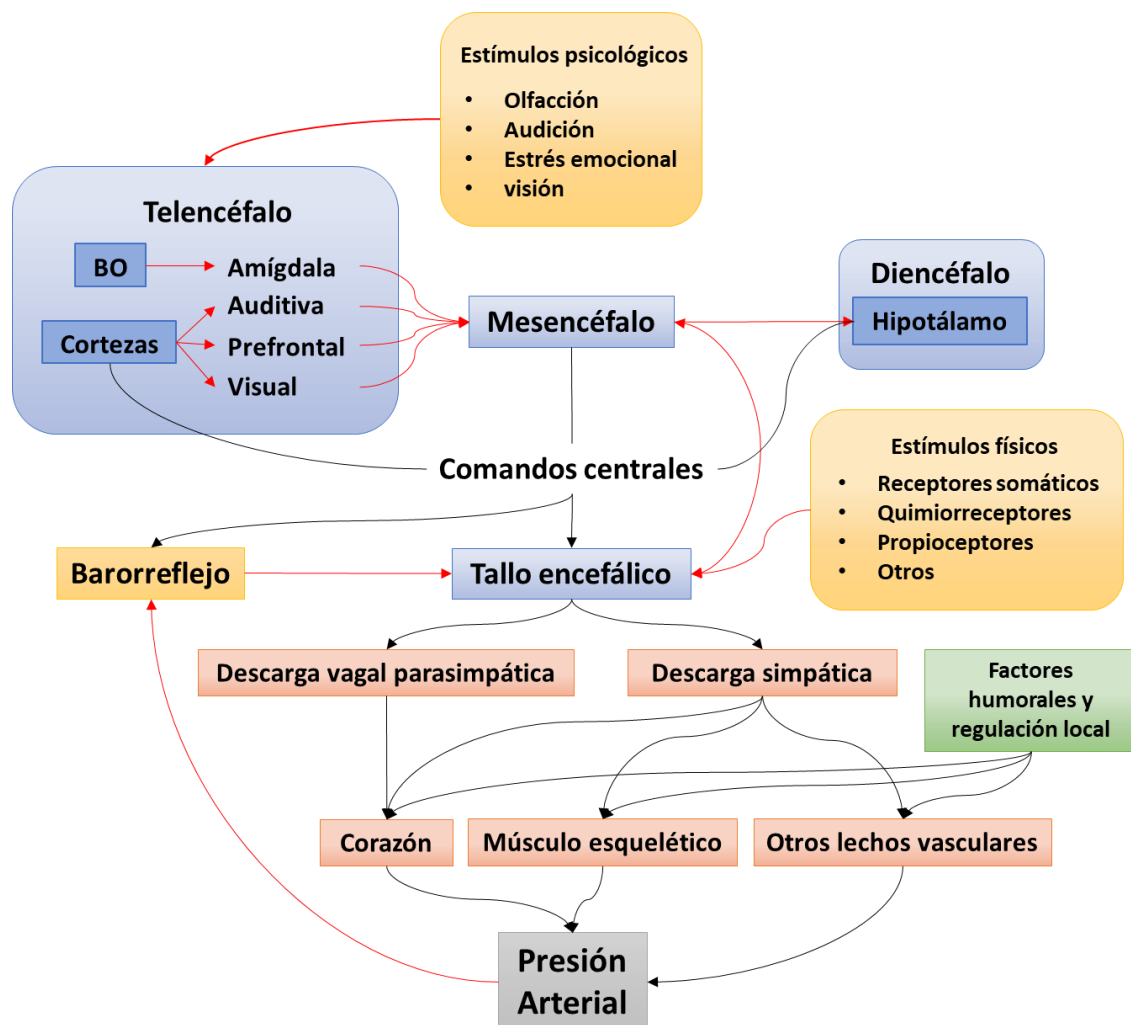
influenciada por el volumen minuto (VM, o gasto cardíaco). A su vez, el VM es el producto de la cantidad de sangre eyectada en cada latido (VS, volumen sistólico) por el número de latidos por minuto (FC, frecuencia cardíaca). Por otro lado, la PAS está afectada por la resistencia total periférica (RTP). La función principal de la regulación de la PA es la de permitir la correcta circulación y un adecuado intercambio de gases, nutrientes y desechos a lo largo de todos los lechos vasculares. Los mecanismos implicados son complejos, pero puede clasificarse en tres categorías principales [36–41]:

- ✓ **Regulación nerviosa:** Estos mecanismos actúan mediante reflejos (*feedback*) o por anticipación (*feedforward*) (figura 1). Ambos tipos de respuestas no son independientes una de la otra, sino que interactúan entre sí. Las vías de retroalimentación en general son respuestas rápidas de ajuste fino implicando la modulación del balance autonómico. El barorreflejo es el clásico ejemplo de este tipo de mecanismo. Allí, los barorreceptores ubicados en el seno carotídeo y el cayado aórtico censan la PA. Ante un descenso repentino de este parámetro aumentará la descarga autonómica simpática. Esto provoca una mayor contracción del músculo cardíaco, un aumento de la FC y de la RTP. Este reflejo provoca un inmediato aumento de la PA. En el caso en que se produzca un súbito aumento, la respuesta predominante será a través del nervio vago disminuyendo la FC regularizando la PA.

Los mecanismos de anticipación también son respuestas rápidas y están relacionadas con la regulación mediada por los comandos centrales superiores (figura 1) [36]. Estos comandos están compuestos por distintos núcleos y áreas fuertemente implicados en la regulación central de la PA. Entre ellos podemos nombrar el hipotálamo, la corteza motora, la amígdala y el cerebelo entre otros. Estos centros actúan sobre el tallo encefálico modulando la descarga parasimpática y principalmente la descarga simpática [36].

Es importante mencionar otros núcleos y áreas relacionadas con la regulación central de la fisiología cardiovascular que modulan la PA, la FC y el balance hidrosalino. Entre estos encontramos sectores del hipotálamo como el núcleo paraventricular (NPV) y el núcleo dorsomedial, el locus coeruleus (LC), las cortezas medial prefrontal e insular y el área gris periacueductal [33,36,42–50].

- ✓ **Regulación humoral:** Los mecanismos humorales de regulación de la PA suelen ser un poco más lentos al ser comparados con la respuesta nerviosa. Incluyen complejos mecanismos como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), las catecolaminas en la médula adrenal, la hormona antidiurética (ADH, o [VP], vasopresina) y los Péptidos natriuréticos (ANP, BNP y CNP) entre otros (tabla 2).
- ✓ **Regulación local:** Factores como las endotelinas (ETs), el óxido nítrico (ON), la adenosina, los niveles de  $O_2$  y el  $CO_2$  modifican el comportamiento de las arterias de bajo calibre, modulando la capacidad de perfusión e irrigación a nivel local en los distintos tejidos. El ON, la adenosina y el  $CO_2$  actúan como vasodilatadores, mientras que las ETs y el  $O_2$  como potentes vasoconstrictores (tabla 2).



**Figura 1. Esquema ilustrativo de la regulación de la presión arterial.** Las líneas rojas representan vías aferentes y las negras eferentes. Los cuadros color naranja representan las distintas fuentes de estímulos intrínsecos y extrínsecos, los cuadros color azul las principales áreas centrales involucradas, el cuadro verde indica los factores humorales y la regulación local, mientras que los recuadros rojos indican los sistemas efectores. Modificado de R. Dampney y col; 2016 [36].

## MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

| Mecanismos       | Factores                                 | Efectos regulatorios                                  |
|------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Nerviosos</b> | Descarga simpática                       | Tono vascular, FC y contractilidad, funciones renales |
|                  | Descarga parasimpática                   | Tono vascular, FC y contractilidad, funciones renales |
| <b>Humorales</b> | Catecolaminas circulantes                | FC y la contractilidad del corazón                    |
|                  | Sistema renina-angiotensina- aldosterona | Funciones renales                                     |
|                  | Vasopresina                              | vasoconstrictor                                       |
|                  | Péptidos natriurético atrial             | vasodilatador                                         |
| <b>Locales</b>   | Endotelinas                              | vasoconstricción/vasodilatación                       |
|                  | Óxido nítrico                            | vasodilatación                                        |
|                  | Prostaglandinas                          | vasoconstricción                                      |
|                  | Adenosina                                | vasodilatación                                        |
|                  | Oxígeno                                  | vasoconstricción                                      |
|                  | Dióxido de carbono                       | vasodilatación                                        |

**Tabla 2. Mecanismos de regulación de la presión arterial.** Se detallan los factores involucrados en los diferentes mecanismos de regulación y sus efectos principales.

### 1.3. El hipotálamo.

Una de las áreas del SNC estudiadas en el presente trabajo de tesis es el hipotálamo (Figura 2). Esta región del cerebro es una compleja estructura compuesta por áreas y núcleos que integran y regulan diversos mecanismos fisiológicos tales como el sistema cardiovascular, el balance energético, el equilibrio hidrosalino, el control de la temperatura corporal y funciones comportamentales de defensa, agresión y reproducción [33,34,42,43,45–47,51,52]. El hipotálamo recibe constantemente información útil para censar en todo momento la situación del individuo y su interacción con el medioambiente. A su vez, modula el funcionamiento de centros superiores e inferiores para otorgar una respuesta acorde a cada situación. Además, es una de las regiones del SNC que presenta mayores cambios funcionales y neuroquímicos en animales hipertensos [14,33,53].

A nivel humoral, el eje hipotálamo-hipofisario cumple un papel fundamental en la regulación de la mayoría de las vías hormonales dado que los factores liberados por el hipotálamo pueden actuar en la adenohipófisis a través de los vasos porta largos. En paralelo, importantes núcleos del hipotálamo como el NPV y el supraóptico (NSO) tienen extensas proyecciones axonales que llegan a la neurohipófisis y permiten enviar a circulación péptidos con función endócrina como por ejemplo la VP.

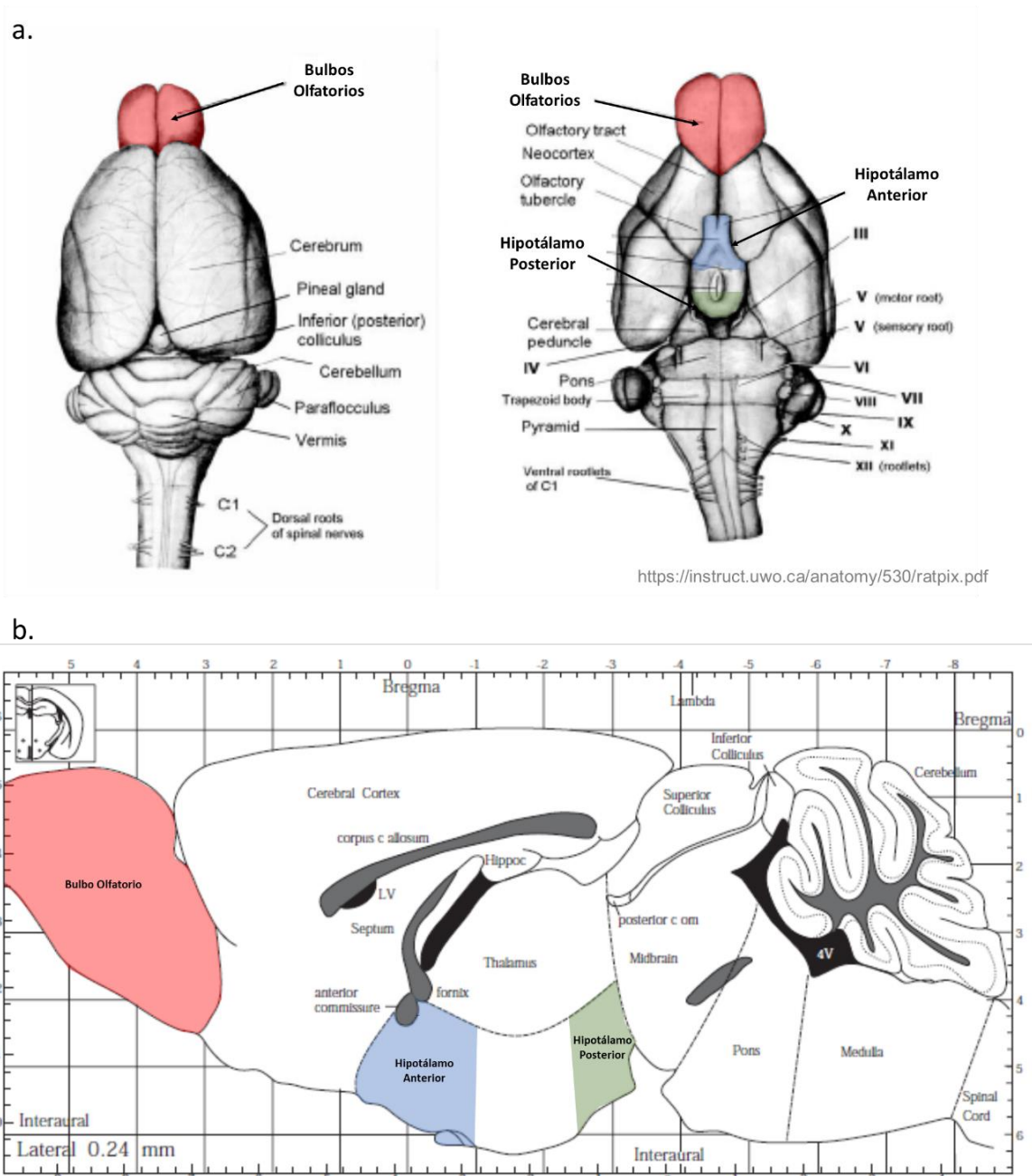
El hipotálamo se encuentra ubicado en la porción ventromedial del diencefalo y puede ser dividido en anterior (HA), medio y posterior (HP) (Figura 2) [33,54–56]. La porción anterior llega hasta el borde posterior del quiasma óptico. El segmento medio puede

subdividirse en dorsal y ventral, se encuentra apoyado sobre el tallo pituitario separándolo de la base del cerebro. Por su parte, el HP limita en su extremo caudal con el área tegmental ventral del mesencéfalo y los cuerpos mamilares.

### **1.3.1. Hipotálamo anterior.**

El HA está compuesto por varios núcleos, entre ellos el NSO, la sección anterior del NPV, el núcleo anteroventral del tercer ventrículo (AV3V, o área de Brody) y el área hipotalámica anterior (AHA) [57–59]. El área AV3V de Brody es una región fundamental para la regulación central de la PA. Tiene como principal componente el núcleo preóptico al que llegan proyecciones desde distintas regiones como el bulbo olfatorio (BO, otra de las regiones del SNC que estudiaremos en este trabajo de tesis), el núcleo del tracto solitario (NTS), los órganos circunventriculares, los núcleos parabraquiales y catecolaminérgicos de la protuberancia, así como también desde el bulbo raquídeo [57–61]. Se ha demostrado que la ablación de esta área en ratas normotensas de la cepa Sprague-Dawley produce una HTA fulminante [33,60,62] y su estimulación eléctrica reduce la PA tanto en animales normotensos como en modelos animales de HTA como el SHR y el DOCA-sal (utilizado en el presente trabajo) [34,63–69]. Por otro lado, el AHA posee proyecciones neuronales que alcanzan la zona medial del diencefalo la cual está involucrada en la regulación central de la PA tanto en animales normotensos como hipertensos [70,71]. Allí, neuronas noradrenérgicas actúan sobre receptores  $\alpha$ -2-adrenérgicos que llevan a una reducción de la PA [30,34,62,72–76].

La disminución de la actividad neuronal del HA atenúa la respuesta del barorreflejo incrementando la PA [33,42,77]. Además, se demostró que lesiones en este núcleo también aumentan la PA [14,33,62] y que el uso de fármacos hipotensores estimulan la descarga noradrenérgica de esta región [34,68,69]. También se comprobó que una dieta rica en sodio aplicada en ratas Dahl sensibles a la sal produce una respuesta importante en distintas áreas del HA, llevando a un aumento de la PA. Estas modificaciones no se observaron cuando estos animales consumieron una dieta normal [78]. Todos estos trabajos sugieren fuertemente que el HA funciona como un área simpatoinhibitoria y que la respuesta cardiovascular estaría fuertemente condicionada por la activación o inhibición de los núcleos que la componen.



**Figura 2. Representaciones gráficas del cerebro de rata. a.** vista dorsal (imagen izquierda) y ventral (imagen derecha). **b.** vista lateral. En rojo se marcan los bulbos olfatorios, en azul el hipotálamo anterior y en verde el hipotálamo posterior. Modificado de *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Paxinos & Watson, 2007 y de *Rat brain anatomy pictures*, 1996 [79,80].

### 1.3.2. Hipotálamo posterior.

El HP es una conocida región simpatoexcitatoria y presenta numerosas proyecciones aferentes y eferentes provenientes de centros superiores e inferiores, muchos de ellos implicados en la regulación central de la función cardiovascular [33,34,81–84]. Las conexiones aferentes provienen desde la amígdala, el septum, el hipocampo, la corteza orbital, el sistema límbico, el tálamo, el tronco encefálico, el BO

y desde el mismo HA (aunque probablemente estas proyecciones sean bidireccionales) [33,34,79,81,82,84–90]. Por otro lado, las proyecciones eferentes alcanzan la medula espinal, el cerebro anterior y la región cortical, innervando a su vez otras regiones del hipotálamo, el tálamo, la amígdala y el septum.

Se observó que la activación del HP aumenta la descarga simpática y atenúa el efecto bradicárdico del barorreflejo [57,88]. Además, lesiones en el HP reducen la PA en modelos experimentales de hipertensión como el DOCA-sal y el SHR [33,91]. En estos últimos, se observó una mayor liberación de noradrenalina (NA) y de acetilcolina acompañada de la incapacidad del ácido gamma-aminobutírico (GABA) de inhibir neuronas dopaminérgicas [33,69,91–93]. Este desbalance de neurotransmisores podría contribuir al desarrollo y/o mantenimiento del estado hipertensivo [33,91]. A diferencia del HA, estas evidencias indican que el HP funcionaría como un área simpatoexcitatoria y que la respuesta cardiovascular también estaría condicionada por la activación o inhibición de los núcleos que lo componen.

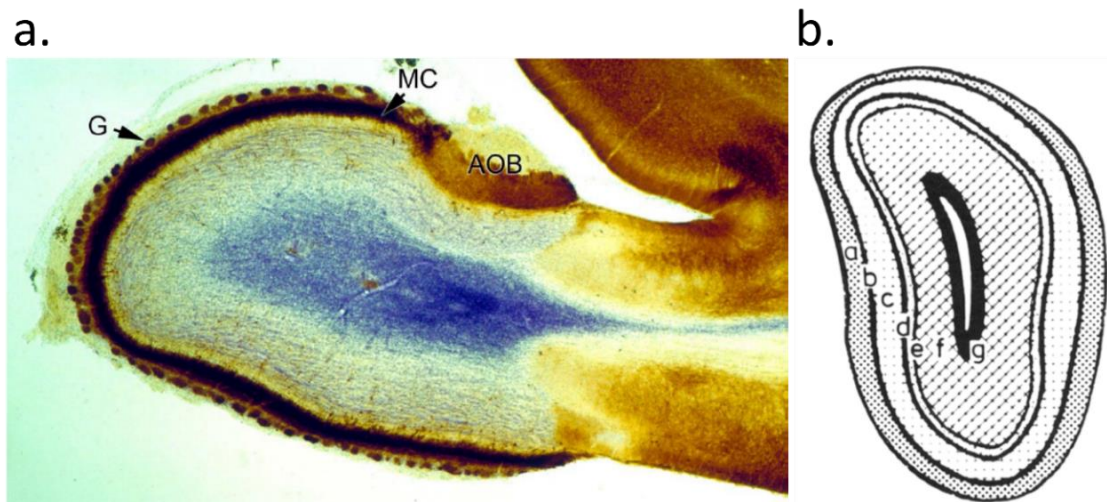
Lo descripto hasta aquí demuestra que el hipotálamo es una región fundamental en la regulación de la función cardiovascular, ya que presenta una alta densidad de fibras noradrenérgicas y regula la PA tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas [33,34,47,67,86,94–96]. Un reciente trabajo demuestra una relación entre las dietas de alto contenido de sodio en distintos tipos de HTA y la importancia de la activación de un área hipotalámica como el NPV lo cual lleva a una mayor actividad vasomotora simpática y un consecuente aumento de la PA [97]. En este sentido, se ha demostrado que el hipotálamo es crucial en la modulación central de la descarga simpática ante la ingesta crónica de elevadas cantidades de sal [98]. A nivel estructural, el hipotálamo juega un papel crítico en la HTA. Esto se comprobó al trasplantar células hipotalámicas de animales hipertensos SHR a animales normotensos que terminaron desarrollando esta patología [99]. Además, la clara división anatómica y funcional entre el HA y el HP nos lleva a pensar que existe una relación estrecha e interdependiente en la regulación de la función cardiovascular.

#### **1.4. Los bulbos olfatorios.**

El BO es la estructura encargada de procesar toda la información proveniente del medio exterior mediante la olfacción. Se encuentra en el extremo anterior del telencéfalo y está constituido por dos proyecciones (bulbos izquierdo y derecho) que representan

aproximadamente el 4% del cerebro de la rata (Figura 2) [100]. Cada bulbo posee una compleja organización conformada por capas celulares concéntricas (Figura 3) [101–103]. Desde la capa exterior a la central encontramos: la capa del nervio olfativo (ONL, de su nombre en inglés *Olfactory Nerve Layer*) seguida de la capa glomerular (GL, *Glomerular Layer*), la capa plexiforme externa (EPL, *External Plexiform Layer*), la capa mitral (MCL, *Mitral Cell Layer*), la capa plexiforme interna (IPL, *Inner Plexiform Layer*) y finalmente la capa granulocítica (GCL, *Granulocytic Cell Layer*). A su vez, cada BO puede separarse en BO principal (MOB, *Main Olfactory Bulb*) y BO accesorio (AOB, *Accesory Olfactory Bulb*) (Figura 3) [102,103]. El MOB recibe información relacionada con los aromas desde el epitelio sensitivo olfatorio y envía proyecciones hacia las cortezas piriforme y prefrontal, el NTS, la amígdala y el hipotálamo. En cambio, el AOB tiene como aferencia más importante el órgano vomeronasal, relacionado con la detección de feromonas. Esta área envía sus proyecciones a la amígdala, el NTS y núcleos olfatorios accesorios [104]. Toda la información proveniente del epitelio olfativo que es proyectada hacia el MOB lo hace por medio del nervio olfatorio que se encuentra recubierto por células gliales. Dentro del BO, los nervios pierden el recubrimiento de células gliales y sus terminales glutamatérgicas descargan en los glomérulos olfatorios de la GL donde se integra toda la información [102]. Allí la señal se procesa a través de interneuronas periglomerulares GABAérgicas y dopaminérgicas entre otras. Las proyecciones de las GCL llegan hasta esta zona y se proyectan a través del tracto olfatorio por medio de las células mitrales y empenachadas [104].

El BO tiene numerosas conexiones con otras regiones del SNC y ello proporciona una idea del amplio espectro de funciones biológicas en las cuales estaría involucrado [105]. Esta región conecta con áreas del sistema límbico como la amígdala, el septum, las cortezas piriforme y frontoorbital. También, interactúa con el área preóptica, la región ventromedial e inclusive con el hipotálamo [105–111]. Es importante destacar que muchas de estas regiones y áreas tienen una participación crucial en la regulación central de la función cardiovascular modificando directamente la PA [110,112–115]. Este es el caso del NTS el cual es considerado el sitio primario para la integración de aferencias viscerales como el barorreflejo [116,117]. Un importante núcleo noradrenérgico como el LC inerva el BO desde sus capas centrales disminuyendo la inervación hacia la periferia del mismo [118,119]. Esta aferencia neuronal corresponde al 40% de la inervación extrínseca total y se ha comprobado que resultan cruciales en la modulación de la olfacción y el aprendizaje olfativo [119].



**Figura 3. Organización del bulbo olfatorio de rata.** a. Corte longitudinal del bulbo olfatorio. Se observan algunas de las diferentes capas celulares que lo componen. G: capa glomerular; MC: células mitrales; AOB: bulbo olfatorio accesorio. Modificado de Elsaesser y col; 2007 [103]. b. Representación del corte coronal del bulbo olfatorio donde se muestran las distintas capas celulares concéntricas. Se marcan a: capa glomerular; b: capa granular externa; c: capa externa plexiforme; d: células mitrales; e: capa interna plexiforme; f: capa granular interna y g: capa granulocítica. Modificado de Heine, Galaburda y col; 1986 [101].

Las interconexiones del BO con diversas áreas del SNC implicadas en la regulación de la función cardiovascular permite suponer que esta área podría jugar un papel importante en la génesis, desarrollo y/o mantenimiento de la HTA. Existen muchos trabajos en animales de experimentación que demuestran la existencia de una relación entre la olfacción, el balance autonómico y la fisiología cardiovascular [120]. En este sentido, varias investigaciones orientadas estudiar la depresión sugieren que esta región podría estar relacionada con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como es el caso de la HTA. Se observó que pacientes deprimidos presentan un desbalance en la regulación autonómica que deriva en hipertensión, en aumento de la descarga simpática y de la FC, dislipemia y también enfermedades coronarias [16,121–124]. Por otro lado, en 1937 Allen y col. demostraron que la exposición de perros a diferentes estímulos olfatorios produce alteraciones en la respiración y la PA [125]. Además, en las últimas décadas se observó que ratas consientes expuestas a humo también presentan cambios en la PA, la FC y respiratoria; acompañado de un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático [108,126].

La integridad del BO es necesaria para que el SNC genere una respuesta simpatoexcitatoria normal ante diversos estímulos fisiológicos [127,128]. La bulbectomía bilateral es usada como un modelo experimental de depresión y demostró que incrementa los niveles de NA y la monoamino oxidasa (MAO) en el tronco encefálico [105–107,109,129].

A su vez, la remoción del BO modula el comportamiento de neurotransmisores como la serotonina, acetilcolina, glutamato, GABA y NA [105,109,129]. Además, este procedimiento produce cambios endócrinos, en la termorregulación y comportamentales con una menor respuesta sexual y una mayor actividad exploratoria e hiperactividad. También se observaron cambios en la respuesta inmune y la función cardiovascular [105,109,112,127,130,131]. Algunos autores postulan que, las variaciones producidas en este último punto podrían deberse a las modificaciones en la función autonómica [16,132].

Posiblemente, todos estos antecedentes evidencian la existencia de una estrecha relación entre el BO y la regulación de la función cardiovascular, sin embargo, los mecanismos que subyacen a la misma son aún desconocidos.

## **1.5. El modelo DOCA-sal.**

Los múltiples factores que llevan al desarrollo de HTA demandan diferentes herramientas para poder estudiar los distintos aspectos de esta patología [133]. Existen distintos modelos animales de HTA donde cada uno posee ventajas y desventajas según el enfoque elegido para su estudio [134–136]. Estos modelos pueden ser clasificados de manera general en genéticos o no genéticos.

Entre los modelos genéticos encontramos frecuentemente: las ratas SHR (de su nombre en inglés: *Spontaneously Hypertensive Rats*) y las Dahl sensibles a la sal. Las ratas SHR son de la cepa Wistar y desarrollan la enfermedad de manera espontánea [137]. Se utilizan principalmente en el estudio de la HTA esencial [137–139] y en ellas aparecen complicaciones derivadas del estado hipertensivo como hipertrofia, disfunción endotelial e insuficiencia cardíaca [140–142]. Mientras que las ratas Dahl sensibles a la sal son útiles para estudiar las implicancias de una dieta con alto contenido de sodio. En estos animales esta dieta provoca un aumento en los niveles de NA en el hipotálamo y desarrollan HTA [33,143,144]. Se observó además que la inyección intracerebroventricular (ICV) de NaCl en estas ratas incrementa la PA y la descarga de NA hacia la periferia [145–147].

Por otra parte, los modelos no genéticos son generados mediante la realización de una cirugía, como es el caso de las ratas Goldblatt 1 y Goldblatt 2, o bien por la exposición a factores hormonales, nutricionales, vasoactivos y estresantes. Estos casos incluyen el modelo DOCA-sal, ratas con dieta rica en fructosa que desarrollan síndrome metabólico, la infusión crónica de angiotensina II (Ang-II) o la exposición a estímulos estresantes [134,136,148]. El modelo Goldblatt I se caracteriza por la colocación de un clip en la arteria

del hilio renal, reduciendo el aporte sanguíneo en uno de los riñones mientras que se realiza la nefrectomía del otro. El Goldblatt II se basa en la colocación del clip en uno de los riñones sin intervenir en el remanente. Las características más importantes de este modelo son que permiten estudiar los efectos de distintos grados de insuficiencia renal, y la dependencia del SRA.

En el presente trabajo de tesis utilizamos el modelo DOCA-sal que se caracteriza por una activación neuroendocrina, aumento de la actividad simpática y el desarrollo de expansión de volumen que conducen a elevación de la presión sanguínea (Tabla 3) [53,149]. Este modelo presenta un SRA marcadamente deprimido a nivel periférico, con muy bajas concentraciones circulantes de angiotensina [149]. Además, al desarrollar HTA independientemente de algún componente genético, es útil para estudiar los mecanismos neurales de regulación de la PA y los efectos derivados de la hipervolemia y la ingesta elevada de sal [149]. Además, se ha demostrado que en este modelo las ETs juegan un papel relevante en el aumento de la PA de manera crónica [53,149,150].

El modelo se realiza en ratas de la cepa Sprague-Dawley y consiste en la administración subcutánea de acetato de 11-deoxicorticosterona (DOCA) junto con NaCl 1% en el agua de bebida [107,150,151]. La concentración de NaCl puede variar levemente según la bibliografía consultada y a veces se utilizan mezclas con KCl. La DOCA es un mineralocorticoide análogo de la aldosterona y puede administrarse en forma de pellets o dosis inyectables utilizando como vehículo aceite de sésamo, maíz o soja [152–159]. La administración inyectable permite ajustar la dosis en relación con el peso, especialmente cuando se trabaja con animales jóvenes. Cuando este modelo se combina con nefrectomía unilateral se observa el desarrollo de hipertrofia cardíaca y renal, nefroesclerosis; acompañado de un rápido desarrollo de HTA fulminante [160]. En cambio, el modelo sin nefrectomía genera una HTA progresiva que va de leve a moderada dentro de las primeras 5 semanas de tratamiento. También produce un aumento del gasto cardíaco, hipertrofia del ventrículo izquierdo, disfunción endotelial, glomeruloesclerosis y una marcada poliuria (Tabla 3) [107,149,150,161–163].

Si bien no se conoce en detalle los mecanismos involucrados en el desarrollo de HTA en este modelo, los factores que contribuyen a esta patología pueden dividirse en no neurales y neurales [53,161–166]. Por un lado, los componentes no neurales actúan tanto a nivel central como periférico e incluyen la participación del sistema vasopresinérgico, los péptidos natriuréticos y las ETs, que regulan la actividad cardiovascular y están ampliamente

distribuidos en el cuerpo, incluyendo el SNC [33,53]. En este sentido, se ha observado un aumento de los niveles periféricos circulantes de ETs, en particular de la isoforma 1 (ET-1) y de la actividad de sus receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) [33,150,152,167–169]. El receptor ET<sub>B</sub> a nivel renal responde de manera anormal afectando la regulación del metabolismo hidrosalino. La administración periférica de antagonistas del receptor ET<sub>A</sub> fue evaluada de diversas maneras. La administración oral incrementó los niveles de ET-1 plasmática y redujo la PA media (PAM) tanto en controles normotensos como en los animales DOCA-sal [170]. Un efecto similar sobre la PA se observó en los animales hipertensos al administrarse de forma intravenosa [152]. Por su parte, la administración central de ETs en el área gris periacueductal redujo la PA y la FC de estos animales [171]. Asimismo, la administración ICV de bloqueantes del receptor de aldosterona, así como también algunos diuréticos lograron reducir la PA [172].

| EFECTOS DEL TRATAMIENTO DOCA-sal |                                                    |
|----------------------------------|----------------------------------------------------|
| Componentes                      | Efectos                                            |
| Neural/Neurohormonal             | Aumento de la actividad simpática                  |
|                                  | Aumento de la liberación de vasopresina            |
|                                  | Aumento de la expresión del receptor AT1R          |
|                                  | Disminución de la expresión del receptor AT2R      |
|                                  | Disminución de la expresión de la ACE2             |
| Cardiovascular                   | Aumento de la hipertrofia del ventrículo izquierdo |
|                                  | Aumento del diámetro de los miocitos               |
|                                  | Aumento del gasto cardíaco                         |
|                                  | Aumento de la fracción de eyección                 |
|                                  | Aumento de la resistencia periférica               |
|                                  | Alteraciones en el barorreflejo                    |
| Renal                            | Aumento de la retención de sodio                   |
|                                  | Aumento de la retención de agua                    |
|                                  | Aumento de la liberación de aldosterona            |
|                                  | Desarrollo de hipertrofia renal                    |
| Inmune                           | Aumento de la infiltración de células T            |
|                                  | Aumento de IFN-γ                                   |
|                                  | Aumento de IL-17                                   |
|                                  | Aumento de TNF-α                                   |

**Tabla 3. Efectos del tratamiento DOCA-sal.** Se detallan los componentes afectados por el tratamiento DOCA-sal en las distintas partes del cuerpo. Adaptado de Basting y col; 2017[149].

A nivel periférico se observó que la VP también estaría involucrada tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la HTA de este modelo (Tabla 3) [165]. Se encontró una mayor descarga de esta neurohormona a nivel plasmático acompañada con un incremento de sus sitios de unión en el lecho mesentérico de animales DOCA-sal [173]. Además, es importante destacar que los bloqueantes de Ang-II no reducen la PA en este

modelo [174] por lo cual se lo considera independiente del SRA al menos a nivel periférico. Por el contrario, algunos trabajos indican que en este modelo los sitios de unión al receptor de Ang-II están aumentados en la corteza cerebral, el NPV y en el área postrema, sugiriendo una mayor actividad a nivel central del SRA [175,176].

Varios trabajos demuestran que la DOCA actuaría aumentando la sensibilidad del SNC al sodio, potenciando el apetito por la sal [149,177–180]. Esto facilitaría el aumento de la PA debido a la ingesta en exceso de dicho ion. El modelo DOCA-sal sería dependiente de este factor desde el inicio del tratamiento. Así, se vio que la administración central de bloqueantes de canales de sodio reduce la PA [181]. Además, se encontraron niveles de osmolaridad elevados tanto en sus fluidos corporales como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) acompañado de altos niveles plasmáticos sodio [157,158]. La detección de este ion en el SNC se realiza a nivel de los órganos circunventriculares, principalmente en el órgano subfornical (SFO, de su nombre en inglés: *Subfornical organ*). Allí, se expresa un canal sodio-específico y altamente regulado en células endoteliales y astrocitos [182]. Altos niveles del ion activan la apertura del canal y mediante un complejo mecanismo, neuronas GABAérgicas inhibirían el accionar de otras neuronas implicadas en la regulación de la ingesta de sodio. En este sentido, se demostró que la producción local de la isoforma 3 de las ETs (ET-3), en el SFO modula la sensibilidad del canal por el ion [182]. En coincidencia, se observó que el bloqueo central de los canales epiteliales de sodio, ENaC (de su nombre en inglés: *Epithelial Na<sup>+</sup> channel*), produce una disminución de la PA en animales DOCA-sal y disminuye la expresión de cFOS (factor de transcripción aumentado en los animales DOCA-sal) en el NPV sin afectar otros centros simpáticos inferiores [183]. Todo esto indica que la modulación neuroendocrina del NPV también sería fundamental en el modelo DOCA-sal [183]. A nivel periférico, la retención de sodio se ve facilitada dado un aumento en el tono simpático renal de las ratas DOCA-sal lo cual parece ser un factor muy importante en el desarrollo y mantenimiento de la HTA de este modelo [184].

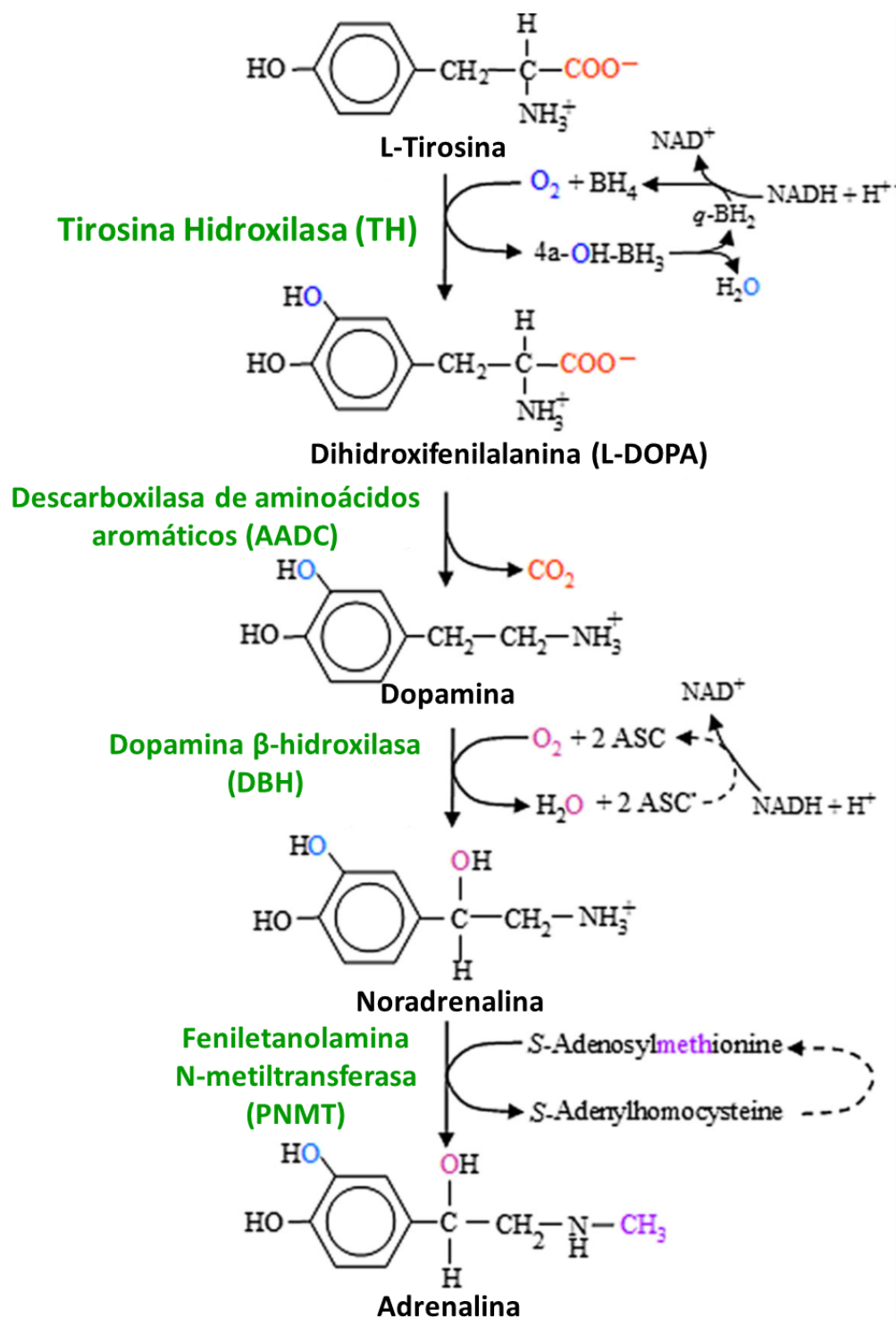
Por otro lado, existen los mecanismos neurales (Tabla 3). Estos actúan principalmente provocando un aumento de la descarga simpática [184]. El sistema catecolaminérgico está alterado en el desarrollo de la HTA de este modelo [75,184]. Por ejemplo, a nivel periférico la cantidad de vesículas catecolaminérgicas, la duración de la secreción de las mismas y la cantidad de catecolaminas secretadas ante un estímulo es mucho mayor en las ratas DOCA-sal que en las normotensas [185]. A nivel SNC, se demostró que la ablación del área postrema o del área AV3V de Brody impide la elevación de la PA y disminuye los niveles de

NA en el tronco cerebral de las ratas DOCA-sal [53,72,186,187]. Además, se comprobó que la estimulación del LC en este modelo lleva a incrementos aún mayores de la PA [93]. También se observó que la estimulación del hipotálamo aumenta la descarga simpática y la respuesta presora sobre los vasos en mayor proporción en los animales DOCA-sal que en las ratas normotensas [188]. Consecuentemente, se ha demostrado que el recambio de NA en el tallo cerebral es menor mientras que, en el corazón, en otros tejidos y en los niveles plasmáticos este recambio está incrementado. Paralelamente, se vio que la disminución de la actividad de neuronas catecolaminérgicas en el HA resulta esencial para la sensibilidad a la sal en este modelo de HTA [189]. Estos resultados sugieren que la menor actividad de vías centrales inhibitorias o el aumento de la actividad de vías excitatorias noradrenérgicas podrían llevar a una descarga simpática aumentada [33,68,150,184,190].

Aunque el modelo DOCA-sal se ha estudiado ampliamente a nivel periférico, los mecanismos centrales subyacentes en su génesis, desarrollo y mantenimiento aún no han sido completamente dilucidados [154,155,191,192]. No se conoce con exactitud cuál es el papel a nivel SNC de los sistemas endotelinérgico y catecolaminérgico en este sentido. Sin embargo, estos trabajos demuestran la existencia de una fuerte relación entre el consumo de sal, el sistema endotelinérgico, la actividad catecolaminérgica y la regulación de la PA en este modelo de hipertensión.

## **1.6. El sistema catecolaminérgico.**

Las catecolaminas son compuestos orgánicos formados por un núcleo catecol y un grupo amino cuya principal función es la de actuar como neurotransmisores. Entre ellas, las más importantes en términos fisiológicos son la dopamina, NA y adrenalina [193]. Los niveles de catecolaminas y sus funciones biológicas están reguladas por los distintos pasos de la neurotransmisión. Estos pasos incluyen la síntesis, el empaquetamiento en vesículas, el transporte, la liberación desde células cromafines y neuronas, las características de sus receptores, la recaptación por parte de las células secretoras y adyacentes, así como también su degradación [194]. Los detalles de la síntesis de catecolaminas pueden observarse en la figura 4 [195].



**Figura 4. Biosíntesis de catecolaminas.** En color verde muestran las enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas, con especial énfasis en la tirosina hidroxilasa (TH). En azul y rosa se muestran los átomos de oxígeno involucrados en los pasos de hidroxilación, en rojo se marca la molécula de  $CO_2$  liberada por descarboxilación y en lila la transferencia del grupo metilo. Modificado de Tekin y col; 2014 [195].

### 1.6.1. Regulación de la tirosina hidroxilasa.

La tirosina hidroxilasa (TH) regula el paso limitante en la biosíntesis de las catecolaminas convirtiendo la L-tirosina en L-DOPA [196,197] (figura 4). Esta enzima es considerada un marcador específico de neuronas catecolaminérgicas y está presente en el SNC (incluyendo el hipotálamo y el BO), la médula adrenal y en tejidos innervados por el sistema nervioso simpático [194,196,198–201].

La TH pertenece a la familia de enzimas hidroxilasas de aminoácidos dependientes de bipterina y hierro [202,203]. Estructuralmente es un tetrámero, donde cada subunidad posee un dominio N-terminal regulatorio y un dominio C-terminal catalítico con un peso molecular entre 50-60 Kda (Figura 5.a-c) [196,198]. Para desempeñar en óptimas condiciones su actividad la TH requiere de varios cofactores entre los que se encuentran la tetrahidrobipterina, el oxígeno y el hierro [196,198,199,203]. La regulación de la TH es muy compleja, sus niveles de expresión y actividad dependen de mecanismos que actúan a corto y a largo plazo (Figura 5) [194–199,204,205].

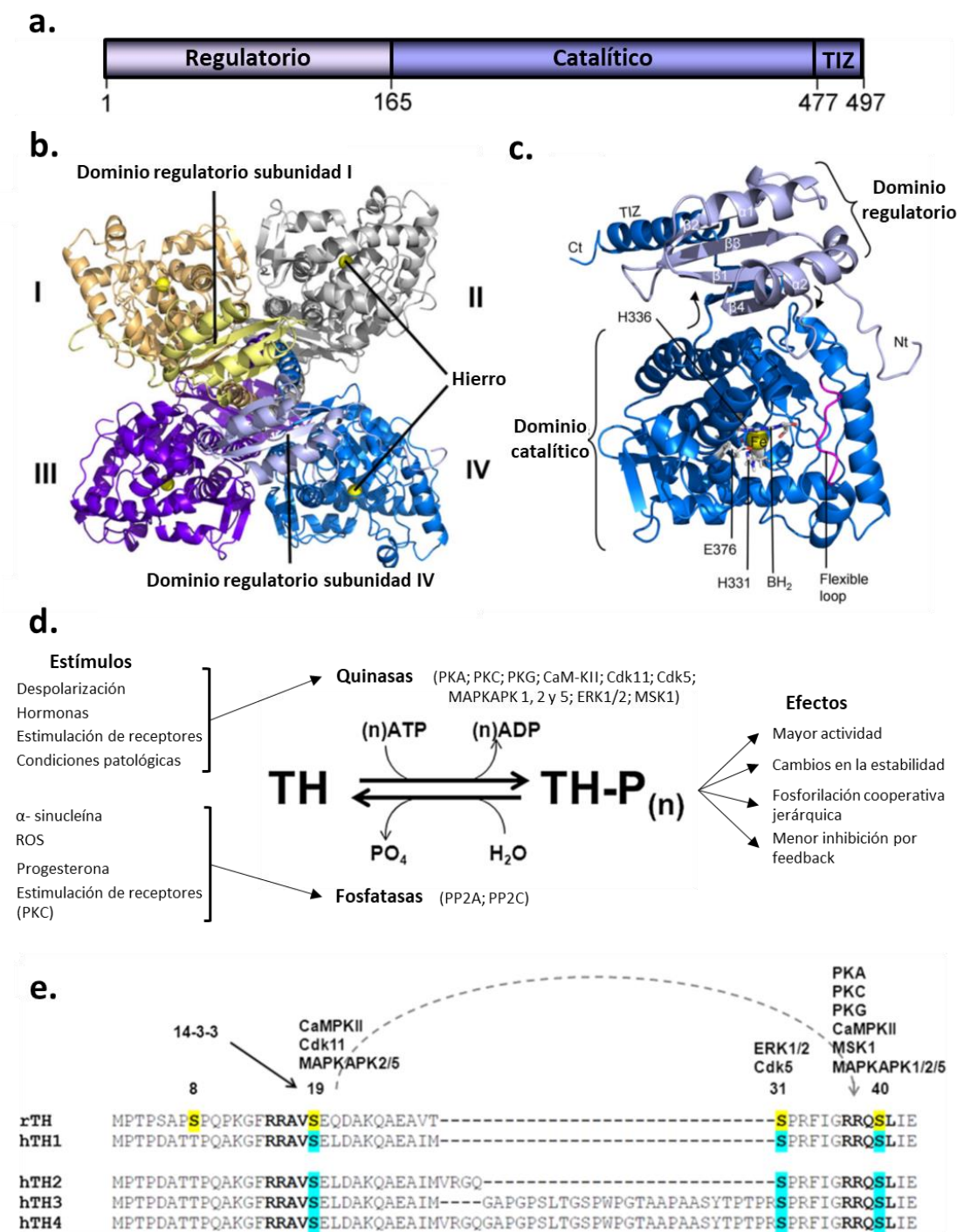
- ✓ **Regulación de la tirosina hidroxilasa a corto plazo:** Estos mecanismos incluyen la inhibición por retroalimentación (*negative feedback*), la regulación alostérica y principalmente el equilibrio entre las distintas formas fosforiladas y desfosforiladas de la enzima [194,198,199,206].

La inhibición por retroalimentación ocurre ante un aumento del producto final principalmente por dopamina y NA. Las catecolaminas forman un complejo con la TH-Fe<sup>3+</sup> disminuyendo su actividad, pero a su vez le otorgan una mayor estabilidad [198,199,203]. Por otro lado, existe un equilibrio entre el estado de fosforilación y desfosforilación de la enzima que determina su nivel de actividad (Figura 5.d). Este equilibrio depende de distintas fosfatasa y quinasas que responden a una amplia variedad de estímulos fisiológicos. Las fosforilaciones o desfosforilaciones que más influyen sobre la actividad y estabilidad de la TH ocurren en diferentes aminoácidos serina ubicados en el dominio regulatorio. Estos sitios son las serinas situadas en la posición 8, 19, 31 y 40 (Figura 5.e) [194,198,199,202,207]. La serina 8 es fosforilada por el complejo p34cdc2 y p58 cyclin-A (cdc2/cyclin-A) principalmente involucrado en la regulación de la división celular. Hasta el momento no se conoce si la fosforilación en este sitio repercute sobre la actividad o estabilidad de la TH. La serina 19 es fosforilada principalmente por la CaMKII y por la MAPK. Si bien esta

fosforilación no activa directamente la TH, en presencia de la chaperona 14-3-3 induce un cambio conformacional en la enzima que la hace más susceptible a la fosforilación en la serina 40 [199]. Por su parte, la activación de la vía PKC permite que la MAPK pueda fosforilar la serina 31. Este evento produce un aumento moderado de la actividad de la TH [208]. Por último, la serina 40 es el sitio más promiscuo y produce un significativo aumento de la actividad enzimática. Las quinasas que actúan fosforilando la TH en la serina 40 son primordialmente la PKA, PKC, PKG y la CaMKII [195,198,199,202,207,209,210]. Si bien la fosforilación es considerada un mecanismo de regulación enzimática a corto plazo también interviene en la modulación de la activación y estabilidad de las TH sintetizadas de novo como consecuencia de procesos regulatorios a largo plazo [194,198,199,211–216]. Por otro lado, en cuanto a la desfosforilación de la TH, la PP2A y la PP2C son las dos principales fosfatasas involucradas (Figura 5.d) [199,217,218]. La PP2A interviene en la desfosforilación de las serinas 19 y 31 solo cuando la TH está en bajas cantidades o cuando su fosforilación en la serina 40 es reducida [219]. En cambio, a altas concentraciones de TH prevalece la desfosforilación por parte de la PP2C [198,199]. Además, la velocidad de desfosforilación de la serina 40 por parte de la PP2A disminuye cuando la serina 19 se encuentra fosforilada [199].

- ✓ **Regulación de la tirosina hidroxilasa a largo plazo:** En término de horas o días la regulación de la TH está modulada por distintos mecanismos. Estos involucran la síntesis y estabilidad de su ARNm, fenómenos de *splicing* alternativo, regulación de la traducción y la estabilidad de la enzima. En este sentido, diversos trabajos muestran que la administración de glucocorticoides, nicotina o el stress por inmovilización pueden producir modificaciones de los niveles del ARNm de la TH [220–225]. Si bien altos niveles del ARNm de la TH no siempre implican una mayor expresión y/o actividad de esta enzima, frente a diversos estímulos esta modulación diferencial del gen de TH bien podría conducir a cambios en el comportamiento postraducciona [194,198,199]. La región 5' del gen de TH contiene diversas secuencias homólogas a elementos regulatorios altamente conservados en rata, ratón, bovino y humano. Estos elementos incluyen: AP1, octamer, Sp1 y CRE entre otros [226–228]. Los factores de transcripción más relevantes en la modulación de

la síntesis del ARNm de la TH son CREB (de su nombre en inglés *cAMP response element-binding*), c-Fos y c-Jun [196,198,205,229–232].



**Figura 5. Estructura y regulación de la tirosina hidroxilasa.** **a.** Estructura lineal del monómero de la tirosina hidroxilasa detallando el dominio regulatorio en el amino-terminal, el dominio catalítico y el dominio de tetramerización (TIZ) en el carboxi-terminal. **b.** Representación gráfica tridimensional de la estructura cuaternaria de la TH. **c.** Representación gráfica tridimensional del monómero de la TH remarcando los diferentes dominios. El sitio activo contiene el Hierro y los aminoácidos His331, His336, y Glu376, que lo coordinan. **d.** Regulación de la tirosina hidroxilasa por quinasas y fosfatasas, se detallan los estímulos y los efectos sobre la enzima. **e.** Secuencia aminoacídica del dominio regulatorio de la tirosina hidroxilasa de rata (rTH) y las variantes humanas (hTH1, hTH2, hTH3 y hTH4), en color se remarcen los sitios serina susceptibles de ser fosforilados. Modificado de Tekin y col; 2014 [195].

Se demostró que la activación de las vías PKA, PKC y el uso de agentes que movilizan calcio inducen la expresión del gen, involucrando el accionar de estos factores de transcripción [194,196,198,199,205,229–232]. En este sentido, la administración de cocaína conduce a un aumento en los niveles del ARNm y la actividad de la TH estimulando factores de transcripción que se unen a sitios AP-1 y CRE [227]. Por otra parte, se sabe que sustancias que modulan la función catecolaminérgica a diferentes niveles, alteran la expresión del mensajero y/o la actividad de la enzima [194,198,199].

### **1.6.2. Efectos sobre la regulación de la presión arterial.**

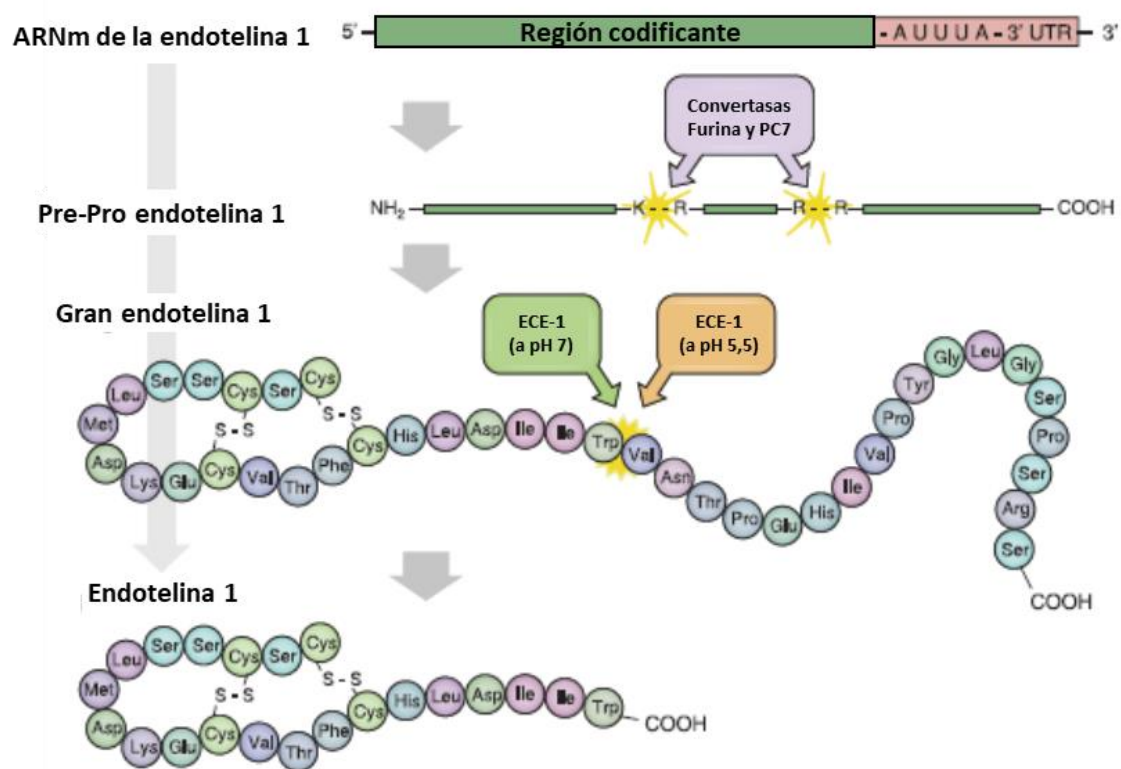
El sistema catecolaminérgico central juega un papel fundamental en la regulación de la fisiología cardiovascular y en los puntos anteriores hemos comentado que la HTA altera su funcionamiento [20,31–33]. Se observó que las dietas altas en sodio modifican el comportamiento de las catecolaminas centrales incrementando la PA [14,16,28,177–180,233]. También, alteraciones en el sistema catecolaminérgico central llevan a modificaciones en la descarga simpática que contribuyen al desarrollo de hipertensión y falla cardíaca, no solo en humanos sino que también en distintos modelos animales de experimentación [14,32,33,46,234–240]. En este sentido, advertimos que el daño al sistema catecolaminérgico en ciertos puntos del SNC atenúa esta patología. Además, se demostró que sustancias que disminuyen la PA modulan el funcionamiento de neuronas noradrenérgicas a nivel central. Asimismo, distintas situaciones patológicas, que incluyen la HTA, alteran la función catecolaminérgica modificando la expresión del ARNm y/o la actividad de la TH [195–199,204–206,241]. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, el papel del sistema catecolaminérgico central en la regulación crónica de la PA y su implicancia en la HTA aún es poco claro.

## **1.7. El sistema endotelinérgico.**

### **1.7.1. Las endotelinas.**

Las ETs son las sustancias vasoconstrictoras más potentes conocidas, componen una familia de isopéptidos de 21 aminoácidos y en su estado maduro se las clasifica en ET-1, ET-2 y ET-3 (Figuras 6 y 7) [242,243]. Cada variante proviene de un gen diferente, y son producto de una serie de procesamientos enzimáticos desde su estado inicial como pre-pro-

endotelina hasta su estado maduro luego de ser modificadas por la enzima convertidora de endotelinas (ECE) (Figura 6) [244,245]. Las ETs están distribuidas a lo largo de todo el organismo, incluyendo el SNC [113,244–246]. La ET-1 es considerada la de mayor respuesta vasoconstrictora y fue identificada periféricamente en células endoteliales, cardiomiocitos, células musculares vasculares de la aorta, células epiteliales y mesangiales renales, células de Sertoli, entre otras. Además, en el SNC está presente en terminales neurosecretoras de la neurohipófisis, en somas de neuronas y astrocitos de áreas como el hipotálamo y el BO entre otras [113,169,242,244,247–252]. La ET-2 se encuentra principalmente en el endotelio vascular y en otros tejidos como el riñón, intestino, miocardio, placenta y útero [248,250]. Por su parte, la ET-3 a nivel periférico se encuentra en el epitelio pulmonar, intestinal y renal entre otros tejidos, mientras que actúa regulando la proliferación y desarrollo de neuronas y astrocitos en diferentes áreas del SNC [169,248–251].



**Figura 6. Biosíntesis de endotelinas.** Se detallan los distintos pasos de la síntesis de endotelinas tomando como ejemplo la ET-1. Modificado de Kohan y col; 2011 [244].

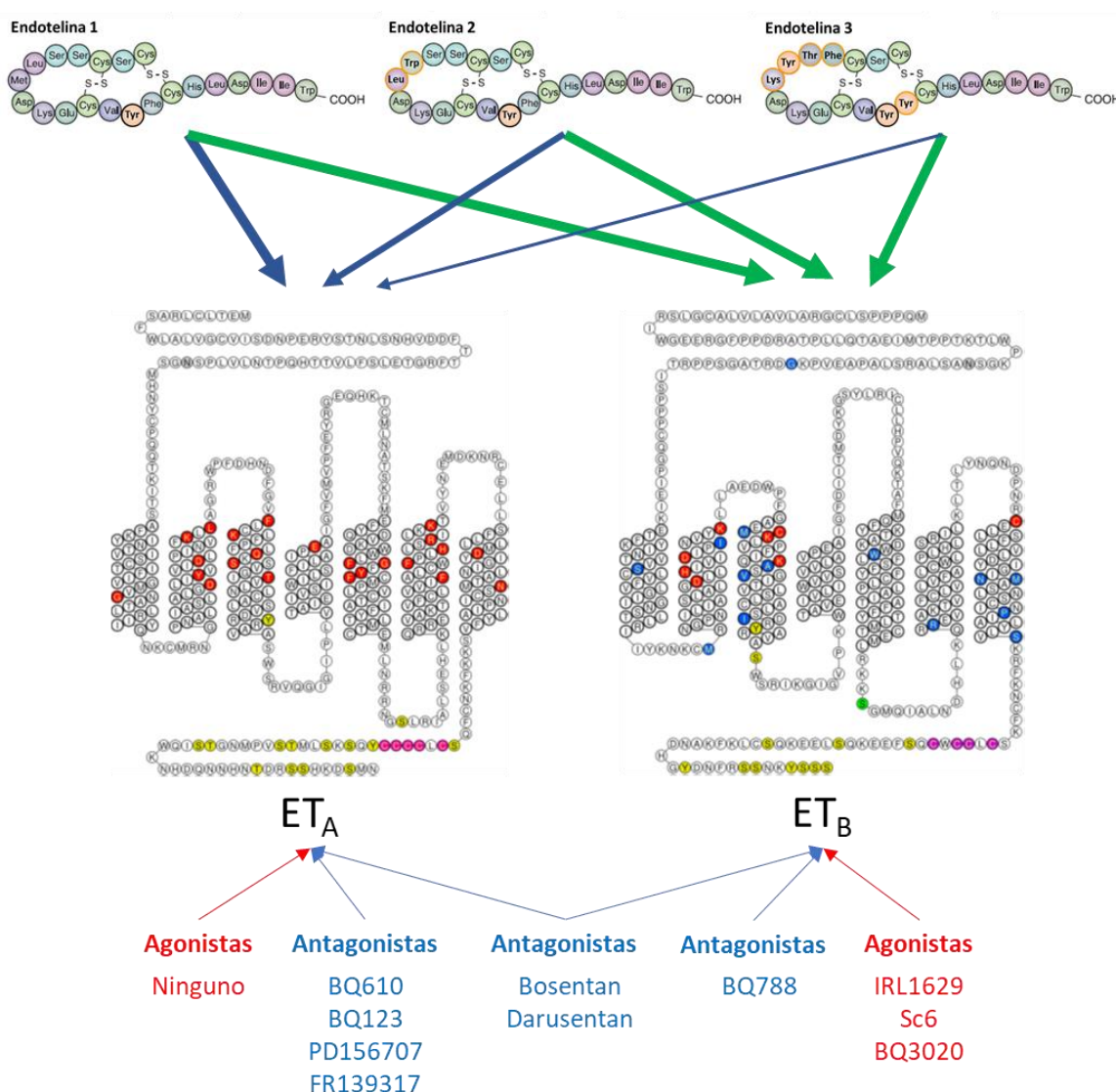
### 1.7.2. Los receptores de las endotelinas.

Las ETs median sus acciones biológicas a través de dos tipos de receptores, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Figura 7). Estos receptores se expresan en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares y pertenecen a la familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs, de su nombre en inglés *G-protein coupled receptors*) [113,244,245,247,250,252–255]. Las distintas ETs difieren en la afinidad por el receptor ET<sub>A</sub>. Por un lado, la ET-1 es la que presenta mayor afinidad por el receptor ET<sub>A</sub>, seguida de la ET-2 y luego la ET-3 (Figura 7). Por otro lado, no se encontraron diferencias de afinidad entre las ETs respecto del receptor ET<sub>B</sub> (Figura 7) [113,244,247,250,252,256,257]. Asimismo, las afinidades de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> por ET-1 son muy similares. Cabe destacar que existe un tercer tipo de receptor denominado ET<sub>C</sub> descubierto en *Xenopus laevis* que tendría homología estructural con ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> [258]. Sin embargo, aún no se ha demostrado su presencia en mamíferos. Por otra parte, diversos autores sustentan la existencia de otros receptores de ETs denominados atípicos o no convencionales (ET<sub>AX</sub> y ET<sub>BX</sub>). Esta idea surge de la observación de respuestas fisiológicas y farmacológicas atípicas frente a los agonistas y antagonistas que definen a los clásicos receptores [211,212,247,250,253,259–266]. Una explicación alternativa plantea que los clásicos receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> podrían formar homo o heterodímeros [267,268]. Además, teniendo en cuenta que el ARNm del receptor ET<sub>A</sub> puede ser procesado mediante *splicing alternativo* [245,269], existe la posibilidad de que estas variantes también puedan ser parte de las combinaciones heterodiméricas.

Existen diversos agonistas y antagonistas útiles para identificar ambos receptores de ETs con importantes funciones farmacológicas en distintas enfermedades, entre ellas la HTA (Figura 7) [270–277]. Entre los antagonistas específicos para el receptor ET<sub>A</sub> se encuentran: BQ-610, BQ-123, FR139317, PD156707. Sin embargo, no existe hasta el momento un agonista selectivo para ET<sub>A</sub>. Por otro lado, el antagonista principal para el receptor ET<sub>B</sub> es BQ-788. Mientras que la lista de agonistas para este receptor está compuesta por: IRL-1620, Sarafotoxina 6c (S6c) y BQ-3020 [245,253,278].

Los receptores de las ETs se expresan en una gran variedad de tejidos, entre ellos se encuentran el músculo liso vascular, cardiomiocitos, fibroblastos y neuronas [279,280]. La activación estos receptores desencadena múltiples cascadas de señalización intracelular proporcionando un amplio abanico de efectos biológicos. Estos efectos se dan principalmente a nivel de la fisiología endócrina y neuroendocrina, la regulación del

crecimiento y proliferación celular, la regulación de la excreción de electrolitos y la fisiología cardiovascular y renal [113,244,245,247,252,256,281,282].



**Figura 7. Las endotelinas y sus receptores.** Esquema de las endotelinas (ET-1, ET-2 y ET-3) y sus afinidades relativas por el receptor ET<sub>A</sub> (flechas azules) y ET<sub>B</sub> (flechas verdes). En la parte inferior se detallan los distintos agonistas (en rojo) y antagonistas (en azul) de los receptores de endotelinas. Modificado de Kohan y col; 2011 y Davenport y col; 2016 [244,245].

Las vías de señalización activadas por las ETs son muy complejas y muchas veces interconectadas. Los mecanismos activados dependerán del tipo receptor (ET<sub>A</sub> o ET<sub>B</sub>), de la proteína G que se estimule (Gs, Gq, Go, Gi), del tipo celular, tejido y de los niveles de ETs circulante [113,253,280,283–285]. La variedad de vías que activan los receptores de ETs y sus múltiples efectos sustentan su clasificación como receptores promiscuos. Entre los diferentes mecanismos encontramos: la fosfolipasa C (PLC) que lleva a la activación de la CAMK y la CAMKII; la vía PKC; la vía de la adenilato ciclasa (AC) que activa la PKA y en

particular, el receptor ET<sub>B</sub> activa la vía de GMPc y de la óxido nítrico sintasa (NOS) [69,113,211,247,282–284,286–303].

### **1.7.3. Endotelinas centrales, el sistema catecolaminérgico y la fisiología cardiovascular.**

Las ETs y sus receptores se expresan en regiones y áreas del SNC relacionadas con la regulación de la actividad simpática, el control de la fisiología cardiovascular y el balance hidrosalino [113,244,304–306]. Se demostró la presencia del sistema endotelinérgico en estructuras como: el NPV, el bulbo raquídeo, el núcleo supraóptico, núcleos hipotalámicos ventromediales, el HA, el HP y en el BO [113,128,265,305]. Es importante resaltar que todas estas regiones presentan a su vez un importante número de neuronas y terminales catecolaminérgicas [113]. Además, en el BO no sólo se ha demostrado la presencia de ETs sino también de sus receptores y otros péptidos reguladores como las angiotensinas y los péptidos natriuréticos, sin embargo, no se conoce aún el papel que todos ellos ejercen en esa región [128,129,131,307]. Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que a nivel del SNC las ETs producen cambios en los diferentes pasos de la transmisión catecolaminérgica, avalando su posible papel como neuropéptidos moduladores [113,161,162,211,212,259–261,266,286,287,308]. En este sentido, se demostró que las ETs se encuentran en mayor concentración en el LCR que en el plasma y en la corteza estimulan la liberación de catecolaminas [33,68,123]. Además, la administración de ETs a nivel central produce un marcado incremento de la PA, y aumenta los niveles plasmáticos de catecolaminas y VP [113,304,309–316]. Asimismo, la inyección tanto ICV como la administración tópica de ETs induce cambios en el patrón cardiorrespiratorio, acompañado de alteraciones en la actividad de neuronas vasomotoras y respiratorias [113]. Nuestro grupo demostró que las ETs modulan la liberación de NA en el HA a través de la activación del receptor ET<sub>B</sub> y la vía del ON [282,286], y que también producen cambios en el HP [286]. Otras publicaciones muestran que la administración de ET-1 en el ventrículo lateral del cerebro o en el área postrema produce una importante respuesta vasopresora [113,281,317,318]. Por otra parte, la inyección de ET-3 en el tercer ventrículo del cerebro induce una respuesta inhibitoria en la ingesta de agua en ratas sometidas a estímulos exógenos o endógenos, sugiriendo un posible papel de las ETs en la regulación del balance hidrosalino [319]. Incluso, se observó un aumento de la actividad simpática producido por las ETs administradas centralmente. Este efecto se revierte al realizar un bloqueo a nivel

ganglionar pero no así por el uso de antagonistas de la Ang-II y la VP [113]. Diversos autores proponen que las ETs modulan a largo plazo el tono vascular tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas [169,281,294,320]. Además, todas estas publicaciones sugieren que las ETs administradas centralmente mediarían sus efectos sobre la vasoconstricción y la PA a través de un aumento de la actividad simpática [33,113,128,304].

Muchos trabajos avalan la idea de que en patologías como la HTA (y en otras no vasculares también) el sistema endotelinérgico podría estar alterado [33,244,245,257]. A nivel periférico, la activación del receptor ET<sub>A</sub> produce vasoconstricción y se ha demostrado mediante su inhibición que está implicado en la generación de HTA experimental en diferentes modelos animales [154,168,244,321]. Por otro lado, estudios de nuestro laboratorio muestran que ambas ETs aumentan la actividad de la isoforma neuronal de la NOS (nNOS), a través de la activación del receptor ET<sub>B</sub> en el HA de ratas [282]. Periféricamente, el receptor ET<sub>B</sub> presenta un rol dual sobre la regulación del tono vascular, por un lado actúa a nivel endotelial incrementando la producción de ON y prostaglandinas que son las responsables de su efecto vasodilatador, y por otro produce vasoconstricción actuando directamente sobre la musculatura vascular lisa [244,247]. Sin embargo, a pesar de todo lo expuesto, aún no se conocen los mecanismos por los cuales el sistema endotelinérgico central actuaría en la regulación de la función cardiovascular, tanto en estados normales como patológicos [113,161,162,211,212,259–261,266,286,287,308].

## **1.8. Asimetrías funcionales.**

Se han realizado muchos estudios con el objetivo de comprender la importancia de las asimetrías anatómicas y funcionales en el sistema nervioso. Estas desigualdades están presentes en todos los animales y cada vez es más habitual encontrar que un hemisferio del cerebro presenta un papel preponderante para ciertas funciones fisiológicas, mientras que el otro hemisferio lo tiene para otras.

Se observó que frecuentemente estas asimetrías bilaterales están involucradas en la modulación neuroendocrina y la transmisión neuronal [322–324]. Se reportaron desigualdades en importantes áreas del cerebro de rata y de ratón como el hipocampo, la corteza, el hipotálamo y el BO [101,322,325–329]. En este sentido, los receptores de mineralocorticoides en el hipocampo de ratón presentan una distribución donde la hemiporción derecha es la predominante [322]. Una tendencia similar se ha descrito respecto de los niveles de NA en el hipotálamo de distintos animales [330]. En relación a la

HTA, varios trabajos muestran que la región derecha del cerebro está más relacionada con el control de la función cardiovascular que la izquierda [323,331]. Se demostró la existencia de una vía descendente asimétrica en el hipotálamo dorsomedial relacionada con la regulación cardiovascular. Allí se observó que la activación de la porción derecha causaba una taquicardia mayor en comparación con la izquierda [323]. Además, los autores encontraron que cada hemiporción hipotalámica modulaba de manera diferencial la PA, la FC y la actividad simpática renal [323]. Asimismo, se vio que pacientes con HTA esencial muestran una mayor liberación de NA en la vena yugular derecha que en la izquierda y que la estimulación del nodo sinusal derecho, comparado con el izquierdo, produce un mayor aumento de la FC [332–334]. Por su parte, Heine y col. encontraron una asimetría anatómica entre las dos hemiporciones del BO siendo la derecha más grande que la izquierda [101]. Estos hallazgos se repiten para otros mamíferos en otras áreas, en las cuales la región derecha es más grande que su contraparte izquierda [325]. Nuestro laboratorio fue el primero en reportar un comportamiento asimétrico entre las hemiporciones derecha e izquierda tanto en el HA como en el BO de ratas DOCA-sal [161].

Por otro lado, también se observaron respuestas simpáticas asimétricas en la corteza insular de ratas Sprague-Dawley y monos *Macaca fascicularis*, hallándose que la porción derecha evoca una respuesta mayor que la izquierda [67,331,335]. Este estudio apoya la idea de que la regulación de la PA y la FC poseen una dependencia mayor del lóbulo derecho del cerebro donde se encuentran neuronas implicadas en el control del barorreflejo [330,331,335]. Otro trabajo demostró que la inyección intraperitoneal de lipopolisacáridos produce una mayor simpatoexcitación debido a la liberación de NA en la rama derecha del sistema nervioso simpático [336]. Algunos estudios sugieren que en todas las formas de HTA la NA es mayor en áreas derechas del cerebro, apoyando la idea de que el control central de la función cardiovascular es asimétrico. Estos antecedentes reportan una amplia variedad de casos de asimetrías funcionales y anatómicas en el cerebro, incluyendo áreas como el hipotálamo y el BO. Muchas de estas asimetrías están relacionadas con la actividad catecolaminérgica y la fisiología cardiovascular, sin embargo, su relevancia fisiológica aún es desconocida.

## **1.9. Antecedentes de nuestro laboratorio.**

Nuestro laboratorio estudia los efectos de las ETs sobre el sistema catecolaminérgico central y sus consecuencias sobre el sistema cardiovascular en situaciones fisiológicas y

patológicas como la HTA. Inicialmente hemos investigado el papel de las ETs a corto y mediano plazo en la modulación del sistema catecolaminérgico en el hipotálamo y el BO de animales normotensos de la cepa Sprague-Dawley. Luego, analizamos la importancia de estos sistemas en un modelo de HTA como el DOCA-sal. En los últimos años, decidimos indagar sobre los efectos de la modulación aguda de los receptores de las ETs sobre el sistema catecolaminérgico central y sobre parámetros hemodinámicos como la PA tanto de animales normotensos como DOCA-sal. A continuación, se describen los principales hallazgos logrados por nuestro grupo de investigación:

### **1.9.1. Modulación del sistema catecolaminérgico por endotelinas en el hipotálamo.**

- ✓ **El hipotálamo en animales normotensos:** A través del trabajo de di Nunzio y col. en 2002, hemos observado que en el HA de animales normotensos la administración *ex-vivo* (tejido aislado) de ET-1 y ET-3 disminuye la liberación de NA a través de un mecanismo que involucra la participación del receptor ET<sub>B</sub> [286]. Estos resultados mostraron la activación de la cascada de señales que involucra la vía ON-GMPc-PKG y el receptor GABA-A. Además, fruto del trabajo de Morgazo y col. en 2005 y Perfume y col. en 2008, vimos que, a través del mecanismo mencionado anteriormente, las ETs reducen la actividad a corto plazo de la TH, disminuyendo en el mediano plazo también su expresión y fosforilación [211,287]. En el trabajo publicado por Hope y col., demostramos que la administración de ET-1 reduce la captación de NA por disminución en la actividad su transportador neuronal (NET, de su nombre en inglés: *norepinephrine transporter*) de manera dependiente de la concentración, mientras que ET-3 produce el efecto contrario [308]. Esto muestra que existe una modulación endotelinérgica de la captación de NA a través del NET que depende del tipo de ET que actúe. Los resultados sugieren que las ETs, mediante una menor activación de la TH, disminuyen la producción y liberación de catecolaminas en el HA. Esto podría proporcionar una menor respuesta simpatoinhibitoria sobre otras regiones moduladas por esta área [211,259,287]. En el HP encontramos que la ET-1 y la ET-3 incrementan la liberación de NA en el corto plazo [266]. Las ETs también disminuyeron la recaptación de esta amina de manera dependiente de la concentración aplicada [261,308]. Además, vimos que ambas ETs incrementan todas las variantes fosforiladas de la TH. En este caso se

observó la implicancia de la vía ON-GMPc-PKG, así como también la CaMKII [259,287]. Por otra parte, a largo plazo las ETs aumentaron la transcripción del ARNm de la TH, así como también su expresión proteica, fosforilación y actividad enzimática. Esto requirió de la activación de AC y la CaMKII [211]. Los resultados sugieren que las ETs, mediante una mayor activación de la TH, incrementa la producción y liberación de catecolaminas en el HP. Esto induciría una mayor respuesta simpatoexcitatoria sobre otras regiones moduladas por esta área.

- ✓ **El hipotálamo en animales DOCA-sal:** Abramoff y col. realizaron experimentos *ex vivo*, en el hipotálamo y el BO de ratas DOCA-sal [161,162]. Se observó que la expresión, fosforilación y actividad de la TH estaba disminuida en el HA de estos animales hipertensos al ser comparado con animales normotensos (Abramoff et al., resultados no publicados). Además, se encontró una disminución de la descarga noradrenérgica acompañada de un aumento en la captación de dicho neurotransmisor. Estos resultados muestran una menor actividad catecolaminérgica en esta región simpatoinhibitoria en el modelo DOCA-sal. Por el contrario, la estimulación a corto plazo del HA con ETs produjo un aumento de la expresión y actividad de la TH. Sin embargo, esto fue acompañado por una disminución en la liberación de NA y de la actividad su transportador. Esto parece indicar que el estímulo endotelinérgico lleva a la acumulación de NA en los terminales noradrenérgicos del HA sin influir en su liberación. Cabe recordar que, a su vez, el aumento en la concentración de catecolaminas puede producir la inhibición de la TH por producto final.

Por otra parte, el HP de los animales DOCA-sal mostró una mayor expresión, fosforilación y actividad de la TH. También se observó un incremento de la liberación de NA y en los niveles y actividad del NET [162]. La incubación del HP con ETs mostró un aumento en la fosforilación de las serinas 31 y 40 de la TH y un consecuente incremento de su actividad enzimática. Esto fue seguido de una mayor liberación de NA y expresión del NET que condujo a una mayor recaptación [162]. Así, los resultados sugieren que en el corto plazo, el estímulo endotelinérgico exacerbaría aún más la descarga noradrenérgica de esta región simpatoexcitatoria en las ratas DOCA-sal [162].

Resultados más recientes, correspondientes al trabajo de la Dra. Guil ([337], Tesis Doctoral, 2017; Guil et al., en proceso), muestran que en animales DOCA-sal la

administración ICV, aguda (1 hora), de un antagonista ET<sub>A</sub> o un agonista ET<sub>B</sub> disminuyen la actividad de la TH en el HP, teniendo como consecuencia una disminución de la PA. También se observó que en esta área hay una mayor expresión del receptor ET<sub>A</sub> respecto del ET<sub>B</sub>, sugiriendo que la respuesta observada sería primordialmente a través del primero. Además, se encontró que estos receptores colocalizan con neuronas catecolaminérgicas a nivel de área hipotalámica posterior. Esto permite sugerir que, si la modulación del sistema endotelinérgico lleva a un aumento en la actividad catecolaminérgica y a una mayor simpatoexcitación, los cambios en la PA podrían ser explicados, al menos en parte, por este mecanismo. Por otro lado, no se observaron alteraciones en la respuesta del HA frente a los tratamientos a corto plazo de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Tampoco se vieron diferencias en las cantidades relativas de estos receptores que, además al ser comparado con el HP, no mostraron una colocalización significativa con neuronas catecolaminérgicas.

### **1.9.2. Modulación del sistema catecolaminérgico por endotelinas en el bulbo olfatorio.**

- ✓ **El Bulbo olfatorio en animales normotensos.** La incubación a corto plazo del BO de ratas normotensas tanto con ET-1 como con ET-3 aumentan la fosforilación de la TH en las serinas 19 y 40, llevando a un incremento de su actividad. Esto ocurrió a través de la activación de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> e involucraron la participación de las vías CAMKII, PCK y PKA [260]. Además, el tratamiento con ETs a largo plazo llevó, mediante la activación del receptor ET<sub>A</sub>, a un incremento del ARNm de la TH, de su expresión proteica, su fosforilación y en consecuencia también de su actividad [212].
- ✓ **El Bulbo olfatorio en animales DOCA-sal:** Los animales hipertensos presentaron niveles de expresión, fosforilación y actividad superiores a los animales normotensos [161]. En particular, se encontró una asimetría funcional entre ambas hemiporciones del BO en estos animales, siendo la región derecha la que exhibió mayores cambios. Por otro lado, la incubación a corto plazo del BO con ETs produjo una disminución de la expresión, fosforilación y actividad de la TH [161]. Más recientemente, los resultados correspondientes al trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Guil [337], muestran que en los animales DOCA-sal hay una mayor expresión del receptor ET<sub>A</sub> al ser comparado con los normotensos. Además, se demostró que

tanto  $ET_A$  como  $ET_B$  colocalizan con neuronas catecolaminérgicas. Se observó también que la administración ICV del antagonista  $ET_A$  (BQ-610) o del agonista  $ET_B$  (IRL1620) por el plazo de una hora en los animales hipertensos reduce significativamente la actividad de la TH. Estos resultados se vieron acompañados por una disminución de la PA. De manera similar a lo observado en el HP, los efectos en el BO de los animales DOCA-sal mostraron una actividad catecolaminérgica aumentada que, junto con los resultados hallados mediante el bloqueo agudo  $ET_A$  o la activación  $ET_B$  sobre la PA, apoyan la hipótesis de que esta región telencefálica podría ser un factor importante tanto en la modulación de la función cardiovascular como de la génesis, mantenimiento y/o desarrollo de la HTA. Estos resultados se ven sustentados con datos recientemente obtenidos en el laboratorio en donde la bulbectomía bilateral en animales hipertensos DOCA-sal produjo una disminución de la PA.

---

## 2. Hipótesis y objetivos

---

A lo largo de la introducción de este trabajo de tesis se puso en evidencia la importancia de una enfermedad de evolución crónica como la HTA. Hemos descripto sus características y la multiplicidad de factores que interactúan en el desarrollo de esta patología, así como también sus efectos sobre los órganos blanco. Realizamos un repaso de las estadísticas disponibles hasta la fecha, basándonos en datos epidemiológicos tanto nacionales como internacionales que hablan de lo silenciosa y peligrosa que es esta enfermedad de alcance mundial. Ha quedado claro que se trata de un grave problema para el sistema de salud. Esto no sólo tiene consecuencias económicas sobre los países, por tener que desarrollar programas de concientización, prevención y tratamiento, sino también a nivel humanitario dada la alta tasa de morbilidad y mortalidad que los efectos derivados de la HTA tienen sobre las personas. A pesar de todos los esfuerzos realizados por los distintos grupos de investigación, los mecanismos que actúan en el origen, desarrollo y mantenimiento de la hipertensión son poco claros y en ciertos casos desconocidos. Hemos puesto un especial énfasis en la importancia del consumo desmedido de sal en la dieta y su contribución al incremento de la PA y las enfermedades cardiovasculares.

Describimos también los distintos mecanismos involucrados en la regulación de la PA, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, en el corto y en el largo plazo. Resaltamos el papel de los componentes centrales y sus consecuencias sobre el sistema nervioso simpático y parasimpático sin dejar de lado las vías humorales y locales. En este sentido, destacamos el papel de dos áreas importantes del sistema nervioso central: el hipotálamo y el BO. Definimos las características anatómicas y fisiológicas del HA, el HP y el BO, siempre en relación con sus implicancias en la regulación de la función cardiovascular y la HTA. Por un lado, subrayamos la importancia del HA y el HP en relación con el control hemodinámico y la modulación del balance autonómico. Por otro lado, en el BO, si bien la relación y dependencia con la función cardiovascular es más distante y muy poco estudiada, se demostró que su integridad resulta fundamental para el correcto control de respuestas cardiovasculares. Estudiando estas áreas nos enfocamos en dos sistemas centrales de gran relevancia para este trabajo de tesis: el sistema catecolaminérgico y el sistema endotelinérgico cuyos componentes principales fueron analizados en detalle. Vimos cómo las catecolaminas centrales son fundamentales (principalmente la NA) en la modulación

tanto a corto como largo plazo de la PA y en la hipetensión, probablemente mediante la modulación de la descarga simpática. En este sentido, los antecedentes de nuestro laboratorio mostraron la existencia de una interacción entre el sistema endotelinérgico y la transmisión noradrenérgica en el HA, HP y el BO de animales normotensos, así como también en el modelo de HTA DOCA-sal. Las características de este modelo animal de experimentación animal fueron expuestas en detalle, remarcando su importancia en el estudio de la HTA sal dependiente con un componente neuroendocrino en su génesis y desarrollo. Asimismo, en experimentos de tejido aislado demostramos de qué manera las ETs modulan diferencialmente la transcripción del ARNm de la TH, así como su expresión, fosforilación y actividad enzimática. Esto fue realizado primero en tejidos de ratas normotensas y posteriormente en tejidos de ratas DOCA-sal. Los últimos descubrimientos del laboratorio fueron en relación con la implicancia a corto plazo de los receptores de las ETs sobre la modulación del sistema catecolaminérgico en las regiones centrales antes nombradas y sus consecuencias sobre la PA. Encontramos que el bloqueo central y agudo (1 hora) de los receptores ET<sub>A</sub> o la activación de los receptores ET<sub>B</sub> disminuye la actividad de la TH en el HP y en el BO de las ratas DOCA-sal, sin presentarse cambios en el HA. Estos experimentos fueron realizados *in-vivo* y tuvieron como consecuencia una disminución significativa de la PA. Además, la distribución y colocalización de los receptores de las ETs con neuronas TH positivas en esas áreas, sugieren que las respuestas observadas serían principalmente a través del receptor ET<sub>A</sub>.

Sobre la base de todo lo expuesto, dado que observamos que las ETs centrales modulan rápidamente el comportamiento del sistema catecolaminérgico en el hipotálamo y el BO con consecuencias sobre el sistema cardiovascular del modelo DOCA-sal y teniendo en cuenta las diferencias en la regulación a corto y largo plazo de la PA, nos preguntamos si las interacciones observadas de manera aguda se ven modificadas a lo largo de un tratamiento crónico. Por ello planteamos como hipótesis que:

**“El sistema endotelinérgico endógeno central regula el comportamiento a largo plazo de la transmisión noradrenérgica y esta interacción estaría involucrada en el mantenimiento y desarrollo de la hipertensión arterial en el modelo DOCA-sal”**

En este contexto, definimos como objetivo general:

**“Investigar la participación del sistema endotelinérgico endógeno central en la regulación a largo plazo de la expresión y actividad de la tirosina hidroxilasa en el hipotálamo anterior, posterior y los bulbos olfatorios de ratas normotensas e hipertensas DOCA-sal. Asimismo, estudiar la correlación de estos efectos sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca”**

El abordaje experimental adoptó los siguientes objetivos específicos:

- 1) Inhibición crónica del receptor ET<sub>A</sub> *in-vivo*:** Administración ICV de un antagonista específico (BQ-610) durante 7 días, tanto en ratas normotensas como hipertensas DOCA-sal.
  - a. Medición de la PAS y la FC para analizar los efectos del bloqueo crónico ET<sub>A</sub> sobre estos parámetros hemodinámicos.
  - b. Evaluación del estado del sistema catecolaminérgico mediante el estudio de la actividad de la TH en el HA, HP, el BO izquierdo y derecho.
  - c. Estudio de la expresión y estado de fosforilación de la TH en el HA, HP, el BO izquierdo y derecho.
  - d. Evaluación de los niveles de expresión del ARNm de la TH en el HA, HP, el BO izquierdo y derecho.
- 2) Activación crónica del receptor ET<sub>B</sub> *in-vivo*:** Administración ICV de un agonista específico (IRL1620) durante 7 días, tanto en ratas normotensas como hipertensas DOCA-sal.
  - a. Medición de la PAS y la FC para analizar los efectos la activación crónica ET<sub>B</sub> sobre estos parámetros hemodinámicos.
  - b. Evaluación del estado del sistema catecolaminérgico mediante el estudio de la actividad de la TH en el HA, HP, el BO izquierdo y derecho.
  - c. Estudio de la expresión y estado de fosforilación de la TH en el HA, HP, el BO izquierdo y derecho.
  - d. Evaluación de los niveles de expresión del ARNm de la TH en el HA, HP, el BO izquierdo y derecho.

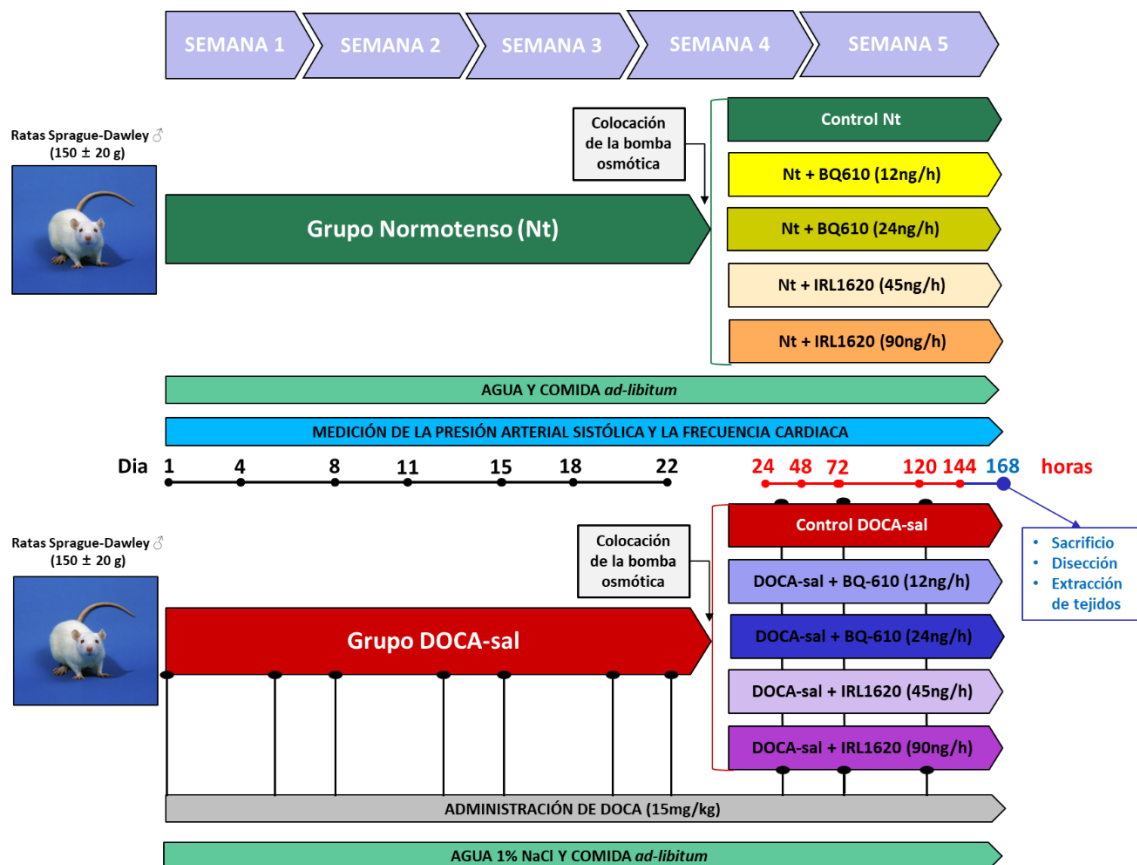
---

## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1. Animales.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley (outbreed Crl:CD) con un peso corporal aproximado de 150 g provenientes del Bioterio Central de la Facultad Farmacia y Bioquímica (FFyB), de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Los mismos contaban con los certificados de análisis microbiológicos que aseguraba la calidad para el trabajo experimental. Los animales fueron alojados en el Bioterio de la Cátedra de Fisiología (FFyB-UBA) y el Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA-UBA-CONICET) bajo la supervisión de dos técnicos profesionales en Bioterio. Se colocó un máximo de dos animales por jaulas de acrílico, bajo condiciones constantes de temperatura ( $22\pm 2$  °C) y humedad (45-55 %), con ciclos alternados de luz/oscuridad de 12hs, con acceso al agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las recomendaciones de la Guía internacional de principios para la investigación biomédica utilizando animales de laboratorio [338] y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio [339]. Además, los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la FFyB-UBA (CICUAL-FFyB-UBA, Nota: 031013-5; Exp-FYB N ° 56106/2013). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de ratas utilizadas y el estrés causado en los procedimientos. A continuación, se describen los distintos pasos del protocolo experimental detallado en el esquema de la Figura 8.



**Figura 8. Esquema del protocolo experimental.** Ratas de la cepa Sprague-Dawley fueron separadas en dos grupos, uno normotenso (Nt) y otro DOCA-sal. El grupo DOCA-sal recibió dos veces por semana una dosis de 15mg/kg de DOCA y bebió agua con 1% NaCl. En la mitad de la cuarta semana se realizó la cirugía para la colocación de la bomba osmótica (recuadro gris) y se conformaron los distintos grupos experimentales para los tratamientos crónicos (7 días) con BQ-610 e IRL1620. En el centro de la figura se indican los días de medición de la PAS y la FC previo al tratamiento (en negro) y durante el tratamiento (en rojo, marcado como horas de tratamiento). Finalmente, a las 168hs de tratamiento se sacrificaron los animales (en azul).

### 3.2. Desarrollo del modelo DOCA-sal.

Los animales con un peso aproximado de  $150 \pm 20$  g fueron divididos al azar en dos grupos, uno normotenso (Nt) y otro al cual se le realizó el tratamiento DOCA-sal (Figura 8). Todas las ratas fueron pesadas dos veces por semana y se registró el volumen de agua consumido. El grupo normotenso fue provisto de agua y el DOCA-sal de agua con 1% de NaCl. El grupo DOCA-sal fue inyectado subcutáneamente dos veces por semana con acetato de 11-deoxicorticosterona (DOCA, Sigma-Aldrich Inc., San Luis, MI, USA) (Figura 8). La dosis fue ajustada de acuerdo con el peso corporal (PC) del animal en una relación de 15mg DOCA/kg (se utilizó aceite de sésamo como vehículo, 1ml/15mg DOCA). La suspensión de la droga se preparó siempre el día anterior a la inyección de cada animal dejándola en agitación toda la noche y cubierta con papel aluminio [161,162]. El modelo DOCA-sal fue desarrollado durante 4 semanas y media. Con el objetivo de controlar el correcto desarrollo

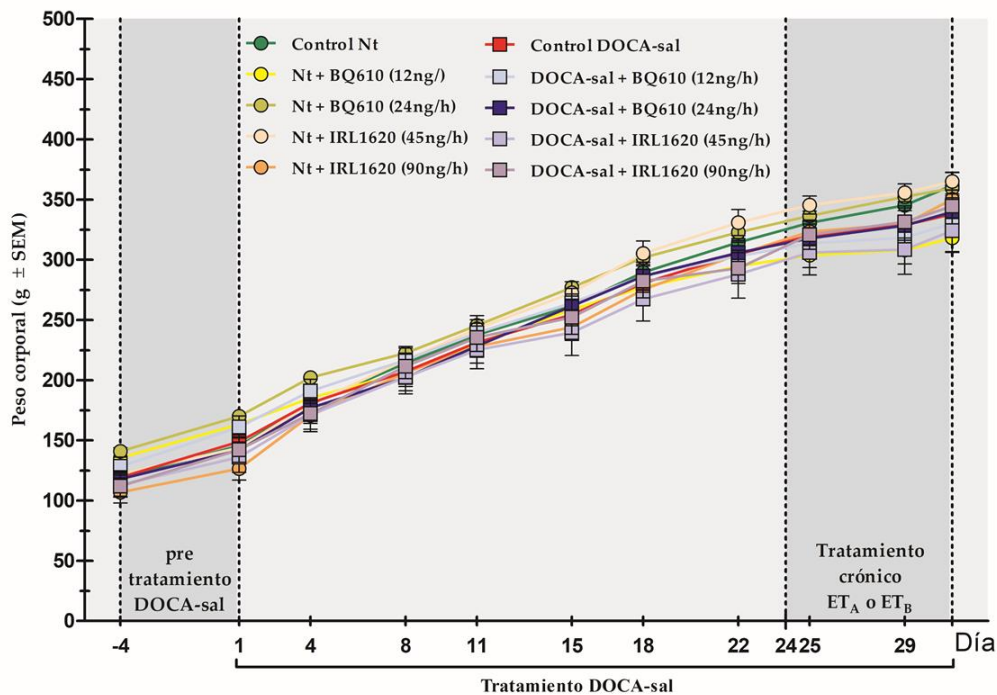
del modelo de HTA se evaluó dos veces por semana la PAS y la FC tanto en los animales Nt como los DOCA-sal mediante el método plestimografía de cola, controlador NIBP (ADInstruments NIBP model 125 Sydney, Australia) y adquisición de datos PowerLab 8/30 (ADInstruments Model ML 870, Sydney, Australia) utilizando un transductor de pulso para ratas (Modelo 5160R, Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, España). Este procedimiento se describe más adelante en el apartado 3.3.4. Al final del experimento cuando los animales fueron sacrificados, se extrajo el corazón para calcular el índice de hipertrofia del ventrículo izquierdo (IHVI). Para esto se utilizó el peso del ventrículo izquierdo (VI) y el PC del animal el mismo día del sacrificio, teniendo en cuenta que no haya diferencias entre el peso de los animales Nt y DOCA-sal. EL IHVI se calculó como la relación de peso del VI respecto de peso total del animal (PC),  $IHVI = VI/PC$  [340]. A continuación, se describen los parámetros estudiados para la caracterización del modelo experimental.

### **3.2.1. Caracterización del modelo DOCA-sal.**

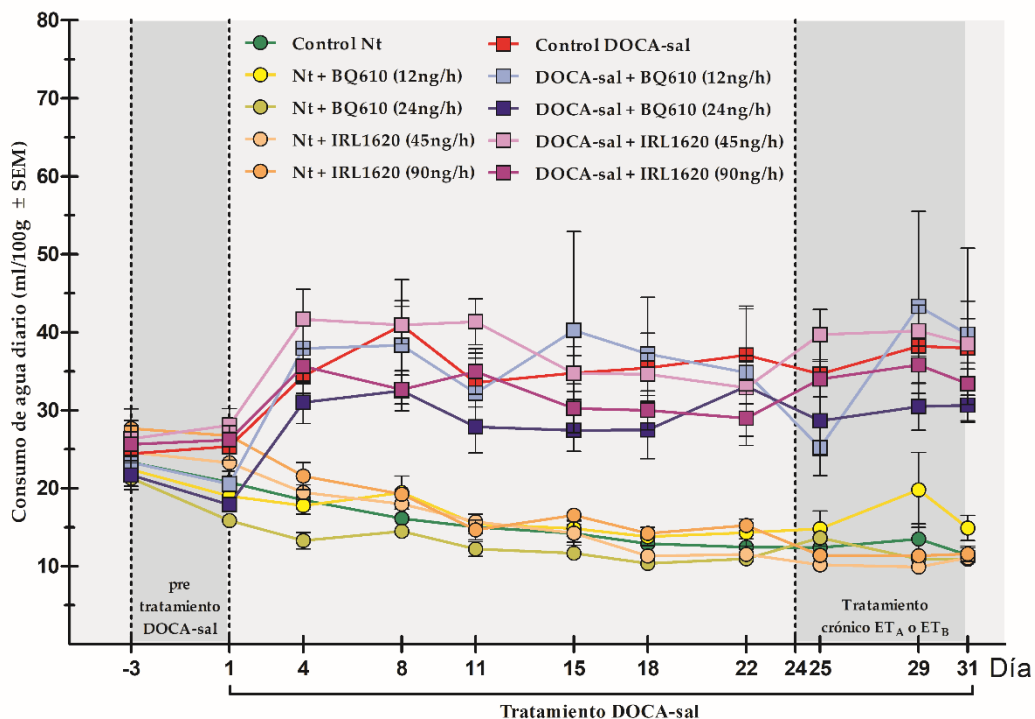
El modelo DOCA-sal desarrolla una HTA progresiva dentro de las primeras 5 semanas de tratamiento. Esto se ve acompañado por otros marcadores derivados del aumento de la PA como por ejemplo el desarrollo de hipertrofia del VI [149,161,162]. Como se mencionó anteriormente, lo largo de todo el procedimiento experimental se evaluó el PC, el consumo de agua, la PAS, la FC y el IHVI como parámetros para evidenciar el correcto desarrollo del modelo DOCA-sal.

La curva de crecimiento (Figura 9) mostró que no hubo diferencias entre los grupos estudiados (Tabla 4) y que los valores estuvieron de acuerdo a lo esperado según el estándar para las ratas macho de la cepa Sprague-Dawley [341,342]. Al día 1 del experimento los animales tuvieron un PC que varió entre 127-170 g (con un promedio global de 149 g). Al momento de la cirugía (día 24) los animales pesaron aproximadamente 300-340 g y fueron sacrificados (día 31) con un PC 320-365g (promedio global de 344 g) (Figura 9).

Por otra parte, se observó un mayor consumo de agua en los animales DOCA-sal comparados con los animales Nt (Figura 10). Esto es de esperar dado que los primeros consumen agua al 1% NaCl y fueron inyectados con DOCA que, como se mencionó anteriormente, actuaría aumentando la sensibilidad del SNC al sodio, potenciando el apetito por la sal [149,177–180]. El volumen calculado fue ponderado por cada 100g de PC del animal para independizarse de esta variable.

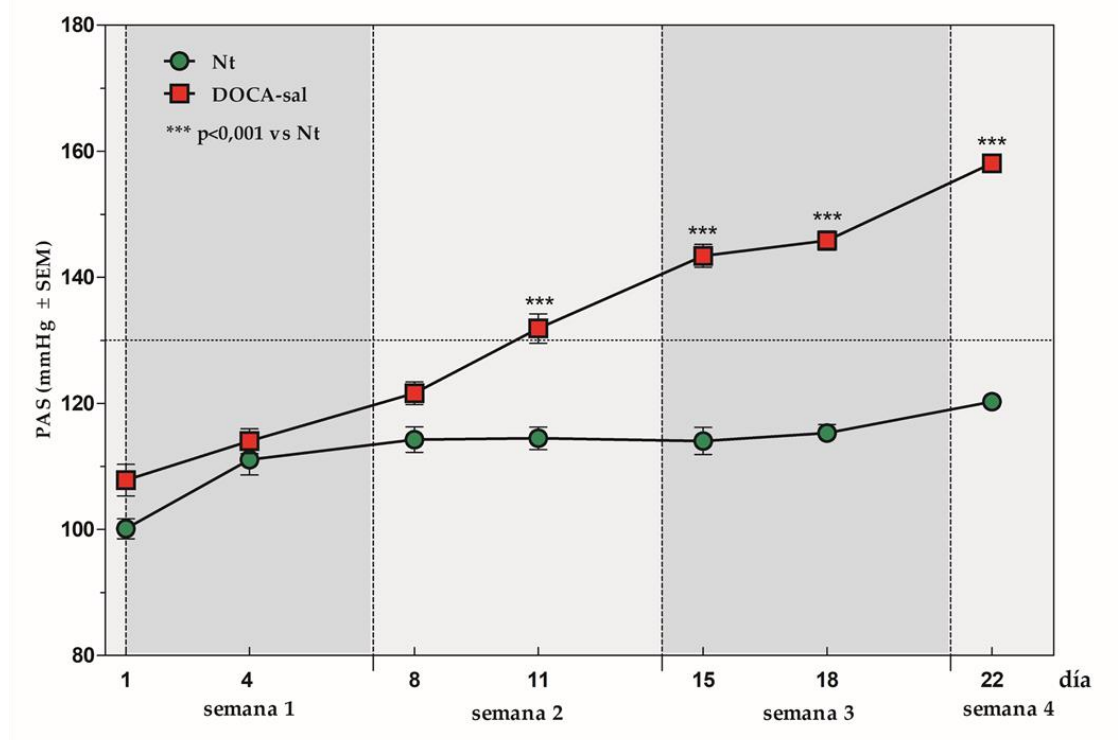


**Figura 9. Curva de crecimiento.** Se describe el crecimiento de las ratas macho de la cepa Sprague-Dawley utilizadas en el presente trabajo de tesis desde 4 días antes del inicio del experimento hasta finalizado el tratamiento crónico con el agonista  $ET_A$  o el antagonista  $ET_B$ . No se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Número de animales: 18-20 (controles), 7-10 (tratamientos BQ-610/IRL1620).

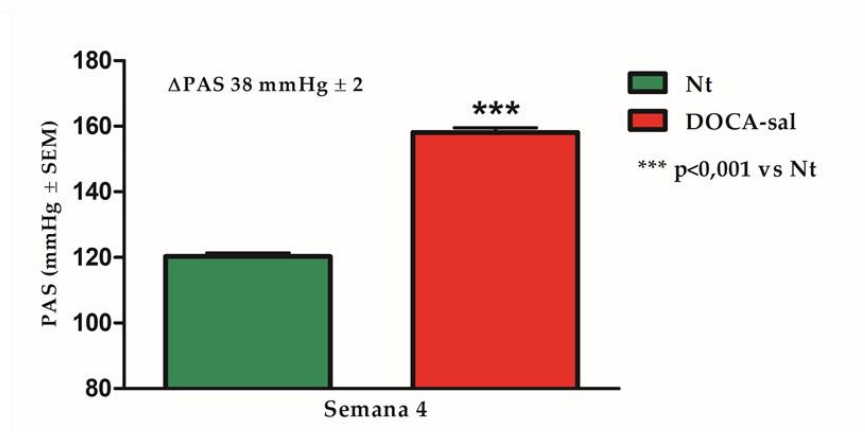


**Figura 10. Consumo de agua.** Se describe el consumo de agua diario de las ratas macho de la cepa Sprague-Dawley utilizadas en el presente trabajo de tesis desde 3 días antes del inicio del experimento hasta finalizado el tratamiento crónico con el agonista  $ET_A$  o el antagonista  $ET_B$ . Las ratas DOCA-sal consumieron agua con NaCl al 1% y las Nt consumieron agua sin agregado de sal. Número de animales: 18-20 (controles), 7-10 (tratamientos BQ-610/IRL1620).

a.

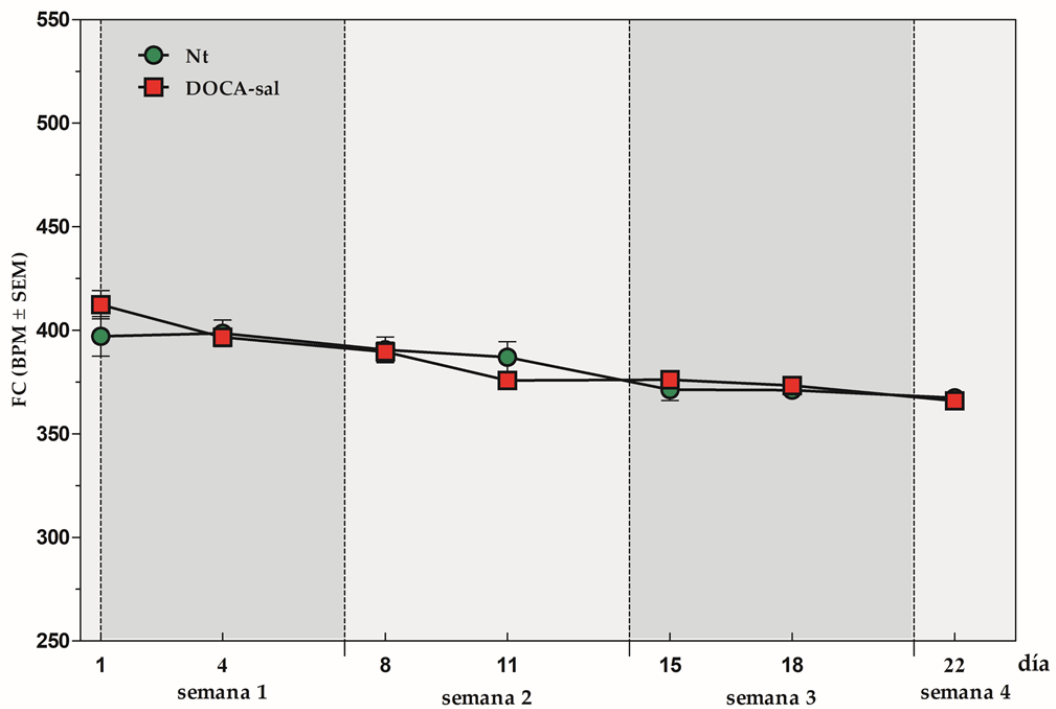


b.

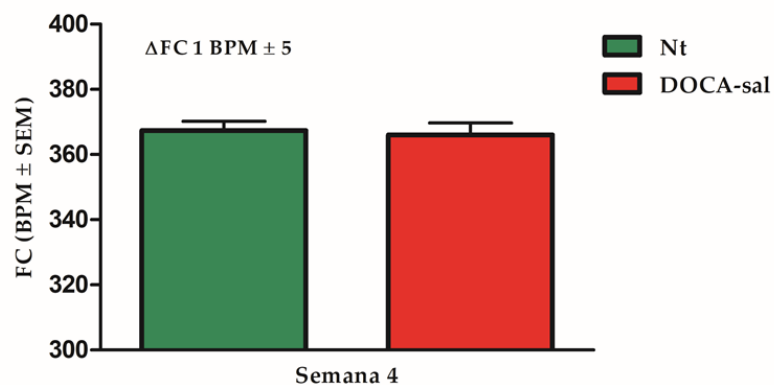


**Figura 11. Presión arterial sistólica durante el desarrollo del modelo DOCA-sal.** a. Se describen los valores de la PAS (mmHg) en función del tiempo (días y semanas) para los animales normotensos (Nt) y los que recibieron el tratamiento DOCA-sal. Se realizaron dos mediciones semanales desde el día 1 al día 22. b. Valores de PAS al día 22 (semana 4), los animales DOCA-sal tuvieron un aumento de la PAS de 38 mmHg comparado con el grupo Nt. Estos resultados son utilizados como referencia del estado previo (48hs antes) al tratamiento crónico con BQ-610 o IRL1620. \*\*\* p < 0,001 vs Nt. Número total de animales: 111.

a.



b.



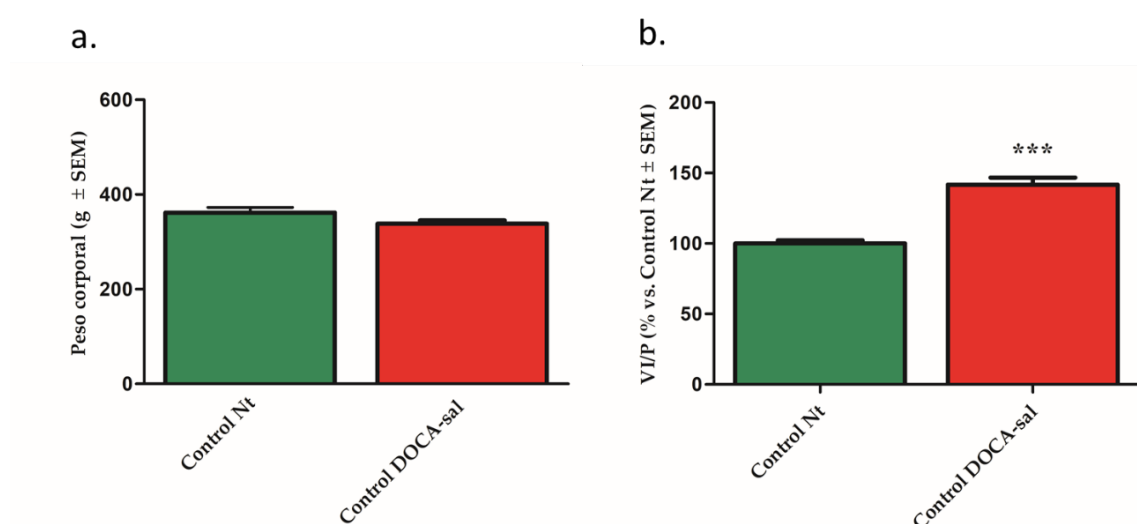
**Figura 12. Frecuencia cardiaca durante el desarrollo del modelo DOCA-sal.** a. Se describen los valores de la FC (BPM) en función del tiempo (días y semanas) para los animales normotensos (Nt) y los que recibieron el tratamiento DOCA-sal. Se realizaron dos mediciones semanales desde el día 1 al día 22. b. Valores de FC al día 22 (semana 4), no se encontraron diferencias entre los animales DOCA-sal y el grupo Nt. Estos resultados son utilizados como referencia del estado previo (48hs antes) al tratamiento crónico con BQ-610 o IRL1620. Número total de animales: 111.

El registro de la PAS durante los primeros 22 días del protocolo mostró que, a partir de la segunda mitad de la semana 2 (día 11), las ratas DOCA-sal se despegaron de los controles Nt de manera gradual, llegando al día 22 (48hs antes de la cirugía) con una HTA evidente (Figura 11.a). Para ese momento, los animales Nt tuvieron una PAS de  $120 \pm 1$  mmHg mientras que los DOCA-sal alcanzaron los  $158 \pm 1$  mmHg (Figura 11.b). A su vez, no hubo variaciones significativas entre ambos grupos en cuanto a los valores de FC durante estas semanas (Figura 12.a). De esta forma, los animales Nt

tuvieron una FC de  $367 \pm 3$  mmHg mientras que los DOCA-sal de  $366 \pm 4$  mmHg (Figura 12.b). Estos valores concuerdan con el desarrollo del modelo DOCA-sal y la diferencia de PAS nos permitió evaluar posteriormente los efectos de los tratamientos crónicos (bloqueo del receptor  $ET_A$  o la activación del receptor  $ET_B$ ) sobre estos parámetros.

Adicionalmente, se realizó el cálculo del IHVI para ambos grupos controles. Al final del protocolo DOCA-sal (día 31) los animales fueron pesados y sacrificados. En ese momento se extrajo el corazón y se obtuvo el peso del VI para calcular la relación VI/PC y obtener así el IHVI. Para poder utilizar este parámetro es importante que no haya diferencias significativas entre los PC de ambos grupos. Efectivamente, no hubo diferencias en el PC (Figura 13.a) y el IHVI mostró un aumento del 42% en las ratas Control DOCA-sal (Figura 13.b).

Finalmente, y a la vista de los resultados, el análisis de todos estos factores ratificó el apropiado desarrollo del modelo DOCA-sal.



**Figura 13. Índice de hipertrofia del ventrículo izquierdo en el modelo DOCA-sal.** **a.** Se describe el peso corporal de los controles normotensos (Control Nt) y DOCA-sal (Control DOCA-sal) una vez finalizado el experimento. No se encontraron diferencias entre ambos grupos. La igualdad en el peso corporal permite evaluar la relación entre el peso del VI y el peso total del animal. **b.** Índice de hipertrofia del ventrículo izquierdo (IHVI). Se observó un incremento del 41% en el IHVI de los animales DOCA-sal. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt. Número total de animales: 41.

### 3.3. Cirugías y procedimientos experimentales.

Durante la mitad de la cuarta semana (el día 24 del experimento), los animales fueron sometidos a una cirugía de acuerdo con el manual de técnicas experimentales y quirúrgicas en animales de laboratorio [343]. En esta cirugía se realizó la colocación de una bomba de microinfusión osmótica cargada con el antagonista  $ET_A$  (BQ-610) o bien con el agonista  $ET_B$

(IRL1620) (Figura 8). Se utilizaron dos posibles dosis para cada droga según se detalla en la tabla 4. A continuación se describen los grupos experimentales, el armado y colocación de las bombas osmóticas, el protocolo de medición de la PAS/FC y la obtención de los tejidos de interés (HA, HP, BO izquierdo, BO derecho y corazón).

### 3.3.1. Grupos experimentales.

Las ratas Nt y DOCA-sal fueron divididas en diferentes grupos según el tratamiento asignado durante la semana final del experimento (Figura 8). Para realizar la administración central crónica de BQ-610, de IRL1620 o vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial, LCRa), los animales que componen los grupos Nt y DOCA-sal fueron distribuidos como indica la tabla 4.

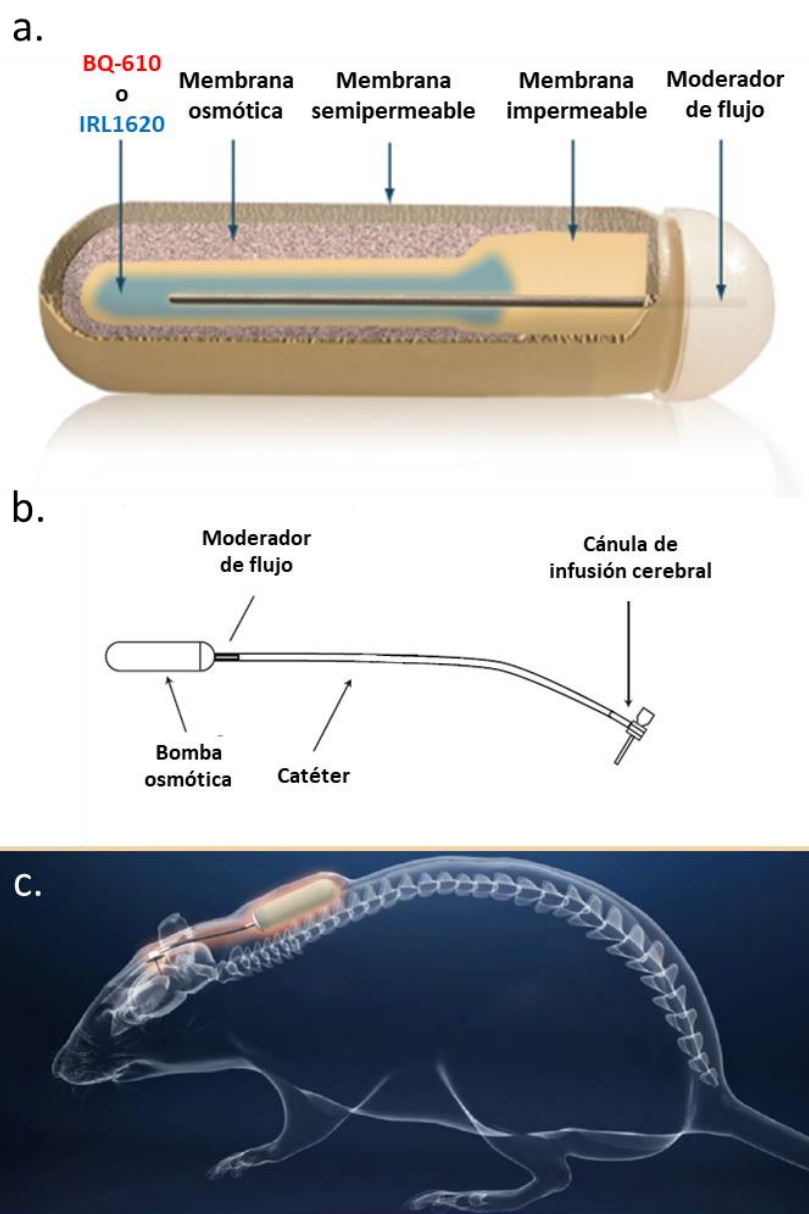
| GRUPOS EXPERIMENTALES           |                             |            |
|---------------------------------|-----------------------------|------------|
| Controles                       | Vehículo                    | Dosis/hora |
| Nt                              | LCRa                        | -          |
| DOCA-sal                        | LCRa                        | -          |
| Bloqueo crónico ET <sub>A</sub> | Antagonista ET <sub>A</sub> | Dosis/hora |
| Nt + BQ610 (12ng/h)             | BQ610                       | 12ng/h     |
| Nt + BQ610 (24ng/h)             | BQ610                       | 24ng/h     |
| DOCA + BQ610 (12ng/h)           | BQ610                       | 12ng/h     |
| DOCA + BQ610 (24ng/h)           | BQ610                       | 24ng/h     |
| Bloqueo crónico ET <sub>B</sub> | Antagonista ET <sub>B</sub> | Dosis/hora |
| Nt + IRL1620 (45ng/h)           | IRL1620                     | 45ng/h     |
| Nt + IRL1620 (90ng/h)           | IRL1620                     | 90ng/h     |
| DOCA + IRL1620 (45ng/h)         | IRL1620                     | 45ng/h     |
| DOCA + IRL1620 (90ng/h)         | IRL1620                     | 90ng/h     |

**Tabla 4. Grupos experimentales.** En las filas superiores se describen los controles normotensos (Nt) e hipertensos (DOCA-sal). En las filas centrales se observan los grupos que recibieron la inhibición crónica ET<sub>A</sub> tanto para los animales normotensos como hipertensos, divididos a su vez en las dos posibles dosis del antagonista (12 o 24ng/h). En las filas inferiores se detallan los grupos que recibieron la activación crónica ET<sub>B</sub> tanto para los animales normotensos como hipertensos, divididos a su vez en las dos posibles dosis del agonista (45 o 90ng/h).

### 3.3.2. Preparación de BQ-610, IRL1620 y las bombas osmóticas.

Se utilizó el antagonista específico ET<sub>A</sub> (BQ-610) o el agonista específico ET<sub>B</sub> (IRL1620) para realizar el tratamiento crónico. Tanto el BQ-610 como el IRL1620 son péptidos hidrofílicos que no atraviesan la barrera hematoencefálica [344–348]. Por esta razón, la aplicación periférica no es útil para evaluar los efectos centrales directos de estas drogas. Por lo tanto, se realizó la administración directamente en el ventrículo lateral del cerebro a través de la colocación de una cánula (ICV). Esta vía es

ampliamente utilizada para el ensayo de fármacos o compuestos con potencial actividad en distintos mecanismos, entre ellos la regulación central de la función cardiovascular. De hecho, esta técnica permitió demostrar que las ETs podían ser consideradas como posibles neurotransmisores [349]. Por otro lado, para realizar la administración de manera crónica, durante 7 días y sin fluctuaciones significativas en la concentración utilizamos bombas de microinfusión osmóticas (Figura 14).



**Figura 14. Bomba de microinfusión osmótica.** **a.** Esquema de una bomba osmótica y sus distintos componentes. Por diferencia osmótica el agua en el líquido intersticial pasa a través de la membrana semipermeable y se acumula en capa osmótica y de esa forma expulsa la droga (en este caso, BQ-610 o IRL1620) hacia el catéter. **b.** Esquema del modelo armado para realizar la infusión intracerebral. La droga expulsada por la bomba circula por el catéter y sale por la cánula en el extremo opuesto. **c.** Esquema de una rata con la bomba osmótica colocada. La droga es descargada por la cánula en el ventrículo lateral del cerebro de la rata. Modificado del manual de canulación intracerebral, ALZET-DUREC ©.

Para el tratamiento con el antagonista ET<sub>A</sub> las bombas osmóticas fueron cargadas con BQ-610 en dos concentraciones: 100ng/ul o 200ng/ul con el objetivo de detectar alguna posible dosis-dependencia de los distintos parámetros analizados. Basado en el flujo de la bomba osmótica (0,12ul/h) se realizó la conversión de las dosis en función de los nanogramos de la droga por hora. Por lo tanto, las dosis de BQ-610 aplicadas fueron de 12ng/h o 24ng/h respectivamente (Tabla 4) [345–347]. Por su parte, para el tratamiento crónico con el agonista ET<sub>B</sub>, las bombas fueron cargadas con otras dos posibles concentraciones: 375ng/ul o 750ng/ul. Quedando las mismas como 45ng/h y 90ng/h respectivamente (Tabla 4) [344,348]. Se utilizó líquido ceforraquídeo artificial (LCRa) como vehículo, según la composición recomendada por ALZET, DURECT Co., CA, USA (cada 100ml: 866 mg NaCl; 23 mg KCl; 21 mg CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 16 mg MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 11 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; llevado a volumen con H<sub>2</sub>O libre de pirógenos).

Las bombas de microinfusión osmótica se armaron según el manual del fabricante (modelo ALZET 1004, DURECT Co., CA, USA) y su funcionamiento se describe en la Figura 14. Una vez cargadas con la droga se las conectó a un kit de infusión cerebral modelo 1 (*Brain infusion kit 1*, DURECT Co., CA, USA). Inmediatamente, fueron incubadas en solución fisiológica a 37°C durante las 48hs previas a la cirugía. Esto permitió que al momento de ser colocadas no se produzcan variaciones en la velocidad del flujo debido a cambios de temperatura.

### **3.3.3. Colocación de la bomba osmótica y la cánula ICV.**

Con el objetivo de colocar la bomba osmótica y la cánula de infusión cerebral en los animales, durante la mitad de la cuarta semana de tratamiento (día 24 del experimento) las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilazina (50/10 mg/Kg, intraperitoneal, IP). Una hora antes de la cirugía y 48 horas después, se administró oralmente a todos los animales una mezcla adecuada de analgésico (ibuprofeno 50 mg/Kg/día) y antibiótico (Amoxicilina 100 mg/Kg/día) [343]. Los animales anestesiados fueron colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf Mod. 900, CA, USA). La bomba osmótica fue colocada subcutáneamente en la región escapular media de la rata y la cánula de infusión fue ubicada en el ventrículo lateral del cerebro según las coordenadas obtenidas del atlas de Paxinos y Watson (-1,9mm; -0,7mm; -3,0mm en los ejes x; y; z respectivamente) [79]. Las bombas osmóticas

administraron de manera crónica, a flujo constante e ininterrumpido el antagonista ET<sub>A</sub> o el agonista ET<sub>B</sub> durante 7 días. Se realizó el seguimiento de la PAS y la FC de todos los animales mediante plestimografía de cola a las 24hs, 48hs, 72hs, 120hs y 144hs (Figura 8), así como también se registró el PC y el consumo de agua. A las 168hs de tratamiento los animales fueron sacrificados.

#### **3.3.4. Registros de presión arterial sistólica y frecuencia cardiaca.**

Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron los registros de la PAS y la FC de las ratas a lo largo de todo el experimento. Cada animal fue evaluado 2 veces por semana hasta el momento de la cirugía, con la intención de confirmar el correcto desarrollo del modelo DOCA-sal (Figuras 11 y 12). Durante la semana de tratamiento crónico, la PAS y la FC fue evaluada a las 24hs, 48hs, 72hs, 120hs y 144hs post-colocación de la bomba osmótica para realizar el seguimiento detallado de estos parámetros durante la etapa final del experimento (Figura 8). El método de *tail-cuff* es una técnica tradicional y de una amplia utilización para la medición de la PA y la FC de manera indirecta [350–354]. La semana anterior al comienzo de experimento se realizaron varias simulaciones para acostumbrar a las ratas tanto al ambiente como al procedimiento siguiendo las recomendaciones bibliográficas [355,356]. Para optimizar las condiciones se trabajó en una habitación silenciosa, con la temperatura controlada, entre las 10 a.m. y 2 p.m. para evitar efectos circadianos [357]. Además, no se usaron cepos de restricción, dado que esto aumenta los niveles de estrés de los animales, simplemente se los cubrió con una manta [355]. Es importante tener en cuenta que a pesar de todos estos recaudos y de que los animales están familiarizados con el operador, no están exentos de cambios en los olores dentro de la habitación, pudiendo esto generar cierto estrés. Sin embargo, todos los animales fueron sometidos a las mismas variables y los registros de PAS y FC, tanto para las ratas normotensas como las DOCA-sal. Además, los valores de PAS y FC registrados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por otros grupos de laboratorio utilizando este y otros métodos [163,183,358–361]. En estas condiciones, los animales fueron manipulados pacientemente, se esperó el tiempo necesario para que estén relajados y luego se colocó el sensor en el extremo anterior de la cola buscando la posición de contacto más cercana a la arteria caudal. En cada sesión se realizaron entre 3-8 mediciones por animal [355] y los registros fueron analizados mediante el programa

LabChart 6.0 provisto por AD Instrument. Los resultados se presentaron como la media de la PAS (mmHg)  $\pm$  SEM y la media de la FC (BPM)  $\pm$  SEM.

### **3.3.5. Obtención y procesamiento de las muestras.**

Una vez cumplidos los 7 días de tratamiento crónico (168hs) las ratas fueron pesadas y sacrificadas por decapitación. Los cerebros fueron removidos y rápidamente colocados en frío. Se verificó que la cánula haya alcanzado el ventrículo lateral y rápidamente se extrajo el HA, HP, BO izquierdo y derecho de acuerdo al atlas de Palkovits & Browstein [54]. También se extrajo el corazón de cada animal para obtener el peso del VI [340].

Según el caso, las muestras de los distintos tejidos fueron procesadas para extracción de ARN y proteínas totales o para medición de la actividad enzimática de la TH. La extracción de ARN y proteínas totales fue realizada mediante el kit TRIreagent según el protocolo del fabricante (TRIreagent, Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). Brevemente, los homogenatos en TRIreagent fueron centrifugados para obtener una separación de las fases orgánica y acuosa, separadas por una interfase anfipática. La fase acuosa fue utilizada para obtener el ARN total y la fase orgánica (junto con la interfase) para obtener las proteínas totales. En ambos casos la purificación se basó en un paso de precipitación, otro de centrifugación y lavados, y un paso final de resuspensión. Es importante destacar que para mejorar el rendimiento de las proteínas se realizó un paso adicional utilizando urea 9,5M + 2% buffer CHAPS al final del protocolo con el agregado de inhibidores de proteasas. Por otro lado, para la medición de la actividad de la TH, las muestras fueron colocadas inmediatamente en un buffer de lisis adecuado. Este protocolo es detallado más adelante.

### 3.4. Drogas y reactivos.

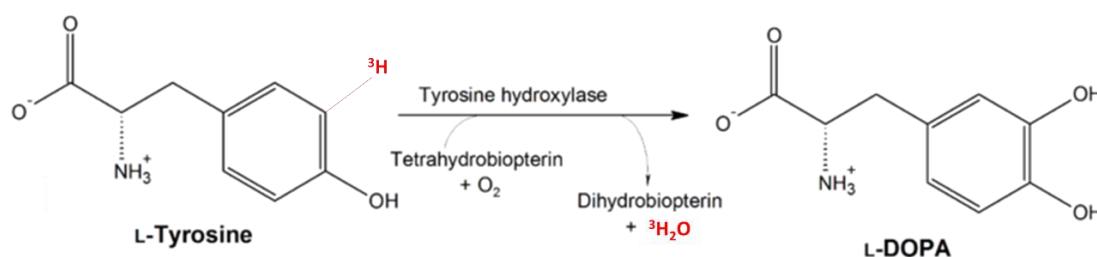
Las drogas y reactivos utilizados en este trabajo se encuentran listados en la tabla 5. El resto de las soluciones y reactivos empleados no listados fueron de calidad analítica o biología molecular.

| DROGAS Y REACTIVOS                                |                                |                         |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Reactivos                                         | Marca                          | Lugar de origen         |
| <b>Bomba de infusión osmótica ALZET 1004</b>      | ALZET DURECT CO                | California, USA         |
| <b>Brain infusion kit 1 ALZET</b>                 | ALZET DURECT CO                | California, USA         |
| <b>DOCA</b>                                       | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b>BQ-610</b>                                     | American Peptide Company       | California, USA         |
| <b>IRL1620</b>                                    | American Peptide Company       | California, USA         |
| <b>TRIreagent</b>                                 | Molecular Research Center Inc. | Ohio, USA               |
| <b>Urea</b>                                       | Biopack                        | Buenos Aires, Argentina |
| <b>CHAPS</b>                                      | Thermo Fischer Scientific      | Illinois, USA           |
| <b>Catalasa</b>                                   | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b>Tetrahidrobiopterina</b>                       | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b>L-tirosina</b>                                 | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b><sup>3</sup>H-L-tirosina</b>                   | Perkin-Elmer                   | Massachusetts, USA      |
| <b>Líquido de centelleo ECOLITE+TM</b>            | MP Biomedicals, LLC            | Ohio, USA               |
| <b>Inhibidores de proteasas</b>                   | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b>Marcador peso molecular (10-170 kDa)</b>       | Thermo Scientific              | Illinois, USA           |
| <b>Ac. anti-<math>\beta</math>-actina (ratón)</b> | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b>Ac. anti-TH total (ratón)</b>                  | SIGMA                          | Missouri, USA           |
| <b>Ac. anti-THser19p (conejo)</b>                 | Chemicon EDM Millipore         | California, USA         |
| <b>Ac. anti-THser31p (conejo)</b>                 | Chemicon EDM Millipore         | California, USA         |
| <b>Ac. anti-THser40p (conejo)</b>                 | Chemicon EDM Millipore         | California, USA         |
| <b>Ac. anti-conejo-HRP (cabra)</b>                | Chemicon EDM Millipore         | California, USA         |
| <b>Ac. anti-ratón-HRP (cabra)</b>                 | Santa Cruz                     | California, USA         |
| <b>Membrana PVDF</b>                              | GE Healthcare                  | Buckinghamshire, UK     |
| <b>Reactivo quimioluminiscente Biolumina</b>      | Kalium Technologies            | Buenos Aires, Argentina |
| <b>Placas radiográficas T-MAT G/RA</b>            | Carestream Dental              | Connecticut, USA        |
| <b>RNasin (inhibidor RNasas)</b>                  | Genbiotech                     | Buenos Aires, Argentina |
| <b>DNasa RQ1 kit</b>                              | Promega                        | Wisconsin, USA          |
| <b>RT-MMLV kit</b>                                | Genbiotech                     | Buenos Aires, Argentina |
| <b>Oligo-dT</b>                                   | IDT                            | California, USA         |
| <b>Primers TH y <math>\beta</math>-actina</b>     | IDT                            | California, USA         |
| <b>Go-Taq polimerasa</b>                          | Promega                        | Wisconsin, USA          |
| <b>Taq polimerasa Pegasus</b>                     | Productos-Bio-lógicos          | Buenos Aires, Argentina |
| <b>Eva Green 20X</b>                              | Biotium                        | California, USA         |
| <b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>                    | Productos-Bio-lógicos          | Buenos Aires, Argentina |
| <b>dNTPs</b>                                      | Productos-Bio-lógicos          | Buenos Aires, Argentina |
| <b>Marcador de peso molecular (50pb)</b>          | Productos-Bio-lógicos          | Buenos Aires, Argentina |

Tabla 5. Drogas y reactivos empleados en el presente trabajo de tesis doctoral.

### 3.5. Actividad de la tirosina hidroxilasa.

La actividad de la TH fue determinada mediante el método radioenzimático descrito por Reinhard y col. [362]. La reacción se basa en la capacidad de esta enzima de convertir L-tirosina en L-DOPA (utilizando una molécula de  $O_2$  y tetrahidrobiopterina como cofactor). Cada conversión de una molécula de L-tirosina culmina con la liberación de una molécula de  $H_2O$  (en relación 1:1). Por lo tanto, utilizando L-tirosina marcada con tritio ( $^3H$ -L-tirosina), al final de la reacción esa marca es transferida a la molécula de agua ( $^3H_2O$ ) (Figura 15). Durante el ensayo se recupera el agua de la reacción, separándola del resto de los componentes mediante carbón activado y centrifugación. El  $^3H_2O$  se cuantifica en un contador de centelleo para determinar finalmente los niveles de actividad de TH.



**Figura 15. Fundamento de la determinación de la actividad de la TH.** Conversión de L-tirosina en L-DOPA que incluye la liberación (1:1) de una molécula de agua. La marca de tritio en la L-tirosina es transferida a la molécula de agua liberada durante la reacción. El agua marcada es cuantificada en un contador de centelleo para determinar la actividad de la enzima.

Los tejidos fueron homogeneizados en 150ul (HA o HP) o 200ul (BO izquierdo o derecho) de buffer de lisis frío (5mM  $KH_2PO_4$  y 0,2% Tritón 100X, pH 7.0). Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 12.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una alícuota del sobrenadante fue apartada y guardada para medir la cantidad de proteínas totales mediante el método colorimétrico de Bradford [363]. En paralelo, se preparó un mix compuesto por 50ul del sobrenadante remanente y 50ul de una solución de reacción (HEPES 50mM, pH 7.0; 15nmol de L-tirosina [0,5uCi  $^3H$ -L-tirosina],  $\beta$ -mercaptoethanol 420mM, 6-metil-tetrahidrobiopterina 0,75mM y 1000u de catalasa). La reacción se llevó a cabo incubando este mix durante 20 minutos a 37°C y fue detenida en hielo. Luego, se tomaron 25ul y se colocaron en 1ml de HCL 1N mezclado con carbón activado (7,5% P/V), esto se realizó por triplicado. Se vortexeó la muestra y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperaron 400ul del sobrenadante para colocarlos en 3ml de líquido de centelleo. El  $^3H_2O$  resultante de la reacción fue cuantificada por centellografía

líquida en un contador de centelleo utilizando un estándar externo (WinSpectral 1414 counter, Perkin Elmer / Wallac). Los datos fueron obtenidos en desintegraciones por minuto (DPM) y fueron normalizados respecto de la cantidad de proteínas totales presentes en cada muestra. Los resultados obtenidos en DPM/ug proteína fueron expresados finalmente como porcentaje vs Control Nt  $\pm$  SEM.

### **3.6. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.**

Se evaluaron los niveles de expresión y el estado de fosforilación de la TH mediante western blot (WB) en el HA, HP, BO izquierdo y derecho de todos los animales. Una alícuota de las proteínas totales purificadas fue utilizada para su cuantificación mediante la técnica colorimétrica de Bradford [363] mientras que el volumen restante fue resguardado a -20°C para su posterior uso en el WB.

Se tomaron 80ug de proteínas de cada muestra y se colocaron en buffer Laemmli (Tris-Cl 62.5mM, pH 6.8; SDS 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%; glicerol 10% y azul de bromofenol 4%). Se incubó durante 5 minutos a 100°C en un baño seco (AccuBlock TM, Baño seco digital, Labnet International Inc.). Las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 10% y separadas según su peso molecular mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizó un marcador de peso molecular (10-170kda) y las condiciones de corrida fueron: 100V (500mA) durante 2:30hs. Las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de PVDF. Las condiciones de transferencia fueron: 150V (400mA) durante 1:20hs en frío. Para controlar la eficiencia de la transferencia los geles fueron teñidos en una solución de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue 0,25% en metanol; ácido acético glacial y agua, 45 : 7 : 48 v/v respectivamente). Por su parte, las membranas fueron controladas con rojo Ponceau (rojo Ponceau 0.05% en solución de ácido acético al 0,1%). Las membranas fueron lavadas con H<sub>2</sub>O y luego colocadas en TBS-T hasta el momento del bloqueo.

Las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital siendo colocadas en una solución de leche descremada al 5% en TBS-T (Tris 0.05M; NaCl 0.2M y Tween-20 0.1%; pH 7.4). Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos en TBS-T durante 10, 5, y 5 minutos respectivamente, también en agitación a temperatura ambiente. Luego, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína de interés (disueltos en 1% leche descremada TBS-T) (Tabla 6). Al día siguiente, se realizaron 3 lavados consecutivos en

TBS-T durante 10, 5, y 5 minutos respectivamente en agitación a temperatura ambiente. Luego, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (disueltos en 1% leche descremada TBS-T) (Tabla 6) durante 1:00h también en agitación a temperatura ambiente. Luego de 3 nuevos lavados con TBS-T (10, 5, y 5 minutos) se realizó el revelado.

La exposición de las membranas se hizo utilizando un reactivo quimioluminiscente Biolumina y placas radiográficas fotosensibles T-MAT G/RA. Se trató de evitar la saturación o subexposición de las bandas obtenidas para su posterior cuantificación. Finalmente, las bandas de interés fueron escaneadas (Scanjet G3110, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), analizadas mediante densitometría (Software ImageJ, herramienta: geles) y normalizadas respecto de la expresión de  $\beta$ -actina (control de carga). Los resultados fueron expresados como densidad relativa vs Control Nt  $\pm$  SEM [161,162,198,211–213].

| WESTERN BLOT: ANTICUERPOS         |         |                    |          |
|-----------------------------------|---------|--------------------|----------|
| Anticuerpo primario               | Especie | Tipo de Anticuerpo | Dilución |
| Anti $\beta$ -actina              | ratón   | monoclonal         | 1:2000   |
| Anti TH total                     | ratón   | monoclonal         | 1:2000   |
| Anti THser19p                     | conejo  | policlonal         | 1:2000   |
| Anti THser31p                     | conejo  | policlonal         | 1:750    |
| Anti THser40p                     | conejo  | policlonal         | 1:2000   |
| Anticuerpo secundario             | Especie | Tipo de Anticuerpo | Dilución |
| Anti ratón (para $\beta$ -actina) | cabra   | monoclonal         | 1:4000   |
| Anti ratón (para TH total)        | cabra   | monoclonal         | 1:5000   |
| Anti conejo (para THser19p)       | cabra   | policlonal         | 1:5000   |
| Anti conejo (para THser31p)       | cabra   | policlonal         | 1:1000   |
| Anti conejo (para THser40p)       | cabra   | policlonal         | 1:5000   |

**Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios.** Detalle de los anticuerpos utilizados para los ensayos de western blot. Todos los anticuerpos secundarios están conjugados con HRP.

### 3.7. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.

Se determinaron los niveles de expresión del ARNm de la TH mediante RT-PCR en tiempo real. El protocolo fue realizado según lo descrito por Nabhen y col. con modificaciones menores [212]. El ADN residual se eliminó tratando las muestras con DNasa durante 40-60 minutos a 37°C. La efectividad del tratamiento fue constatada a través de una PCR de punto final (convencional) (MJ MiniTM thermal cycler, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) utilizando primers de  $\beta$ -actina y no obteniéndose producto alguno excepto en el control positivo. La concentración de ARN total fue determinada por espectrofotometría (relación de absorbancias A260nm/A280nm) y la calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio a 80V durante 20 minutos. El gel fue analizado en un

transiluminador UV observándose las bandas correspondientes a las distintas subunidades del ARN ribosomal (Transilluminator M-20, California, USA).

Se emplearon 2ug de ARN total para la retrotranscripción a ADNc utilizando en la reacción: 200U de transcriptasa reversa MMLV, 25U de inhibidor de RNasas, dNTPs 10mM, 1,08ug de primers oligo-dT. Los productos fueron constatados mediante una PCR convencional y verificando mediante un gel de agarosa la existencia de una sola banda acorde al par de primers utilizados.

| PRIMERS PARA RT-PCR EN TIEMPO REAL. |                                |                              |
|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| ADNc de interés                     | Orientación del primer         | Secuencia                    |
| Tirosina Hidroxilasa                | Sentido ( <i>Forward</i> )     | 5'-AGGGCTGCTGTCTTCCTAC-3'    |
|                                     | Antisentido ( <i>Reverse</i> ) | 5'-GCTGTGTCTGGGTCAAAGG-3'    |
| $\beta$ -actina                     | Sentido ( <i>Forward</i> )     | 5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA-3' |
|                                     | Antisentido ( <i>Reverse</i> ) | 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'  |

**Tabla 7. Secuencias de los primers.** Secuencias de primers utilizadas en las RT-PCR en tiempo real para la amplificación del ADNc de TH y  $\beta$ -actina.

| PROGRAMAS PARA LAS RT-PCR EN TIEMPO REAL |                           |                   |           |
|------------------------------------------|---------------------------|-------------------|-----------|
| ADNc de interés                          | Programa                  | Temperatura       | Tiempo    |
| Tirosina Hidroxilasa                     | Desnaturalización inicial | 94°C              | 5 minutos |
|                                          | Ciclos 35-40              | Desnaturalización | 94°C      |
|                                          |                           | Apareamiento      | 54°C      |
|                                          |                           | Extensión         | 72°C      |
|                                          | Rampa de <i>melting</i>   |                   |           |
|                                          | 77-94°C (0,15°C/seg)      |                   |           |
| $\beta$ -actina                          | Desnaturalización inicial | 94°C              | 5 minutos |
|                                          | Ciclos 30-35              | Desnaturalización | 94°C      |
|                                          |                           | Apareamiento      | 54°C      |
|                                          |                           | Extensión         | 72°C      |
|                                          | Rampa de <i>melting</i>   |                   |           |
|                                          | 77-94°C (0,15°C/seg)      |                   |           |

**Tabla 8. Programas para la RT-PCR en tiempo real.** Configuraciones de corrida utilizadas en las RT-PCR en tiempo real para la amplificación del ADNc de TH y  $\beta$ -actina. La fluorescencia proveniente de cada tubo fue medida una vez por ciclo al final del paso de extensión, a lo largo de todo el proceso.

Se evaluaron los niveles de expresión del mRNA de la TH y de  $\beta$ -actina (como normalizador *housekeeping*) utilizando un termociclador en tiempo real RotorGene Q-series (QUIAGEN, Hilden, Alemania). Las secuencias de oligonucleótidos utilizados como primers se describen en la Tabla 7. Cada reacción se hizo en un volumen final de 20ul conteniendo: 1ul de cDNA, 1ul de Eva Green como fluoróforo (Biotium, San Francisco, USA), 1ul de primers específicos (TH o  $\beta$ -actina) 10mM, 0,6ul de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,4ul dNTPs 10mM, 0,3ul de GoTaq polimerasa, 4ul de GoTaq Buffer 5X y 11,7ul de H<sub>2</sub>O calidad PCR. Primero se realizaron curvas de calibración estándar de entre 5 a 8 puntos para cada par de primers mediante diluciones seriadas utilizando un pool de muestras. Las rectas aceptadas tuvieron un  $R^2 \geq 0,98$  y una

eficiencia de  $1,0 \pm 0,2$ . Además, la especificidad de los productos se corroboró mediante las temperaturas de *melting* ( $T_m$ ), donde se obtuvo un solo pico por encima del valor umbral de referencia (excepto para el control negativo, sin templado) y a través de un gel de agarosa 2% observándose una sola banda del peso molecular correspondiente al fragmento amplificado. Todas las muestras se corrieron por duplicado bajo las condiciones especificadas en la Tabla 8 y los productos de amplificación se describen en la Tabla 9. Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto de  $\beta$ -actina y presentados como porcentaje vs Control Nt  $\pm$  SEM.

| PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN |          |                               |
|----------------------------|----------|-------------------------------|
| ADNc de interés            | Longitud | Temperatura de <i>melting</i> |
| Tirosina Hidroxilasa       | 81pb     | $85,5 \pm 0,3$                |
| $\beta$ -actina            | 69pb     | $82,4 \pm 0,3$                |

**Tabla 9. Características de los productos de amplificación.** Longitud y temperaturas de *melting* de los productos de amplificación de la TH y  $\beta$ -actina obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real.

### 3.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó empleando los programas Graph-Pad Prism 5.0 e Infostat 2016. Todos los resultados son presentados, según el caso, como la media, densidad relativa o porcentaje vs Control Nt  $\pm$  SEM. Para comparar dos grupos experimentales respecto de una variable se realizó una prueba T, utilizando una corrección de Welch cuando las varianzas en los tratamientos fueron diferentes. Cuando se compararon más de dos grupos experimentales se realizó ANOVA de 1 factor seguido de un post-test de Newman-Keuls. Para comparar los efectos crónicos del antagonista  $ET_A$  o el agonista  $ET_B$  sobre la PAS o la FC a lo largo de una semana en animales normotensos y DOCA-sal se realizó ANOVA de 2 factores con post-test de Bonferroni [364]. Los resultados cuyo valor p fue menor o igual a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

---

## 4. Resultados

---

### 4.1. Bloqueo crónico del receptor ET<sub>A</sub>.

Se estudió la implicancia del receptor ET<sub>A</sub> sobre la modulación a largo plazo de la transmisión noradrenérgica y el papel de esta interacción en el desarrollo y mantenimiento de la HTA en el modelo DOCA-sal. Para ello se realizó el bloqueo central crónico de estos receptores durante 7 días y se evaluó la respuesta del sistema catecolaminérgico en el HA, HP, BO izquierdo y derecho. En estos tejidos se determinó la expresión, fosforilación y actividad de la TH, así como también los niveles de su ARNm. Además, se analizaron los efectos de este tratamiento (en dos diferentes dosis) sobre la PAS y la FC tanto para los animales Nt como DOCA-sal.

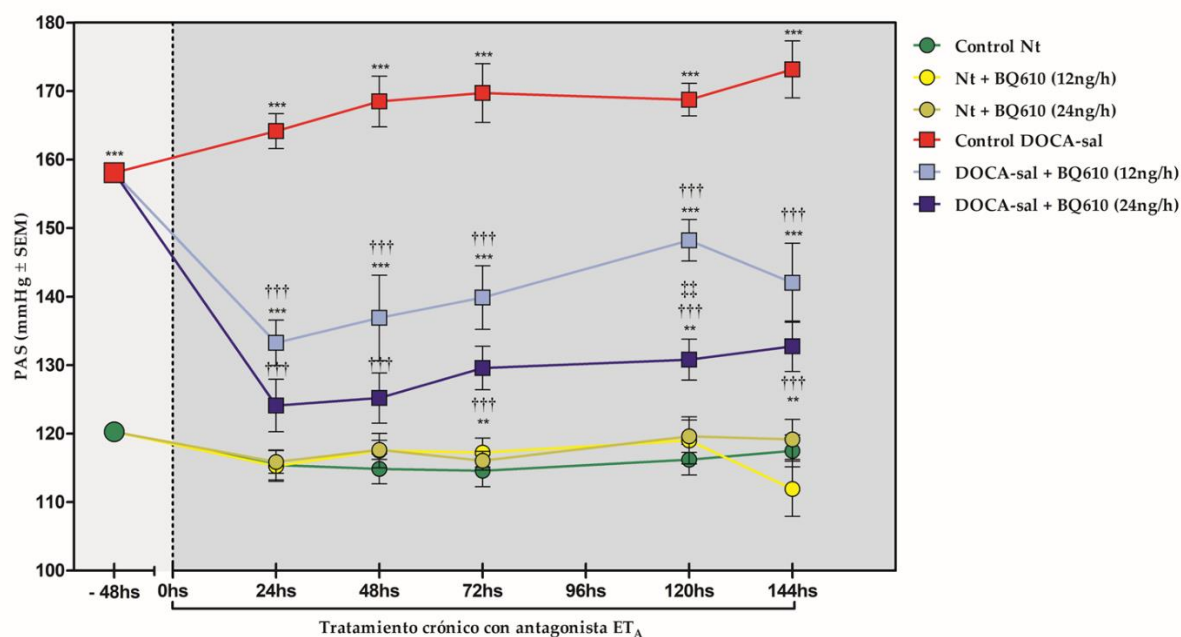
#### 4.1.1. Parámetros hemodinámicos.

Se realizó el seguimiento de los valores de PAS y la FC entre las 24hs y las 144hs de inhibición crónica de los receptores ET<sub>A</sub> centrales. Tomando como referencia los valores de PAS de los animales previo a la administración de BQ-610 (Figura 16. - 48hs, círculo verde), no encontramos variaciones significativas a lo largo de las 144hs de tratamiento entre los controles Nt y los animales Nt + BQ-610 (12ng/h o 24ng/h) (Figura 16).

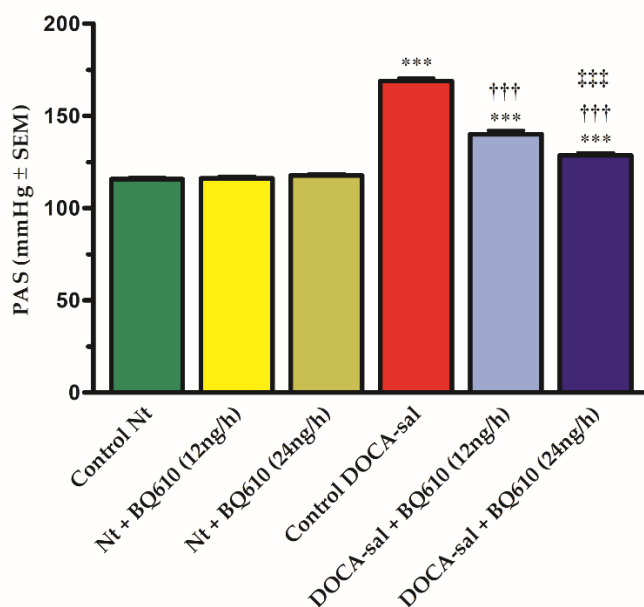
Por su parte, los controles DOCA-sal, que partieron 38 mmHg por encima los Nt (Figura 16. - 48hs, círculo rojo), continuaron incrementando su PAS a lo largo de la semana, alcanzando un máximo de 173 mmHg a las 144hs (Figura 16).

La inhibición crónica del receptor ET<sub>A</sub> produjo una importante disminución de la PAS en los animales DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h). Esta reducción fue más pronunciada durante las primeras 72hs alcanzando un mínimo de 133 mmHg (a las 24hs) y finalizando el tratamiento en 142 mmHg (Figura 16). El efecto del antagonista parecería ser dosis dependiente ya que la administración del doble de la dosis de BQ-610 (24ng/h) incrementa la disminución de la PAS. Si bien las diferencias con el grupo anterior no fueron significativas en todos los puntos estudiados (a excepción de las 120hs), los animales DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) tuvieron valores promedio de PAS menores que los DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h). Además, se observó que durante las primeras 48hs el grupo DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) no presentó diferencias estadísticas con los ninguno de los animales Nt. Así, las ratas DOCA-sal

+ BQ-610 (24ng/h) alcanzaron una PAS mínima de 124 mmHg a las 24hs y finalizaron las 144hs de infusión en 133 mmHg (Figura 16).



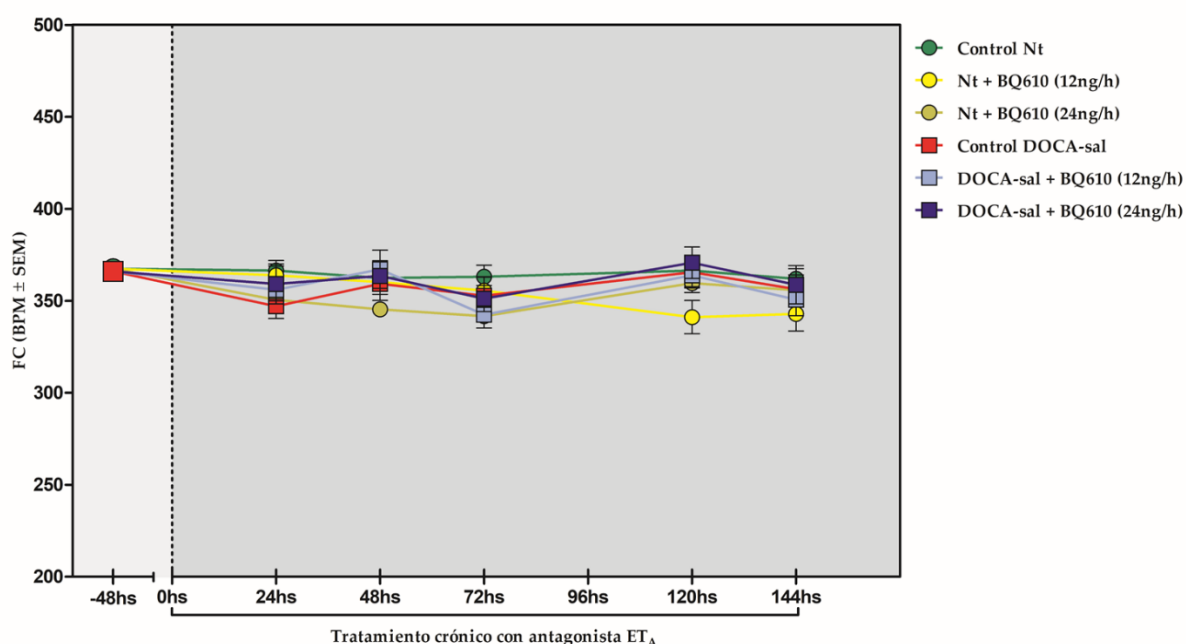
**Figura 16. Modulación de la presión arterial sistólica debido al bloqueo crónico del receptor  $ET_A$ .** Se grafican los valores de la PAS (mmHg) en función del tiempo desde las 24hs hasta las 144hs de infusión crónica del antagonista  $ET_A$  (BQ-610). Los valores de PAS durante las 48hs previas al tratamiento sirven de referencia del punto de partida de todos los grupos experimentales. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal; ††  $p < 0,01$  vs DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h). Número de animales: 18-20 (controles), 7-10 (tratamiento BQ-610).



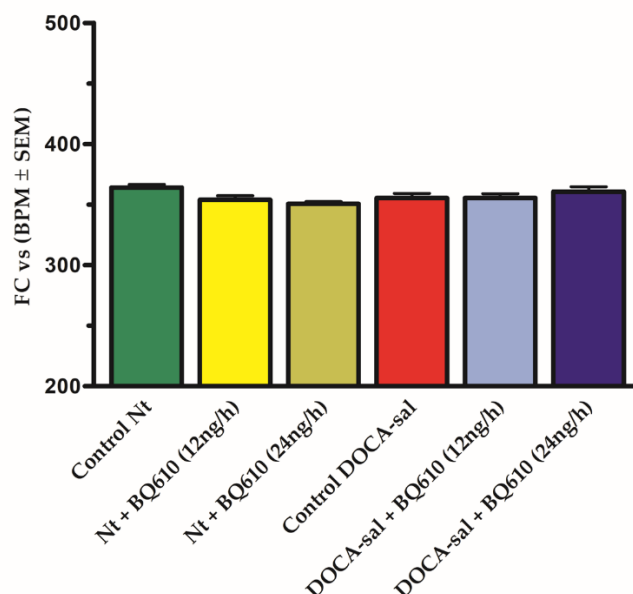
**Figura 17. Presión arterial sistólica media durante el bloqueo crónico del receptor  $ET_A$ .** Se describe el comportamiento general de la PAS (mmHg) durante el tratamiento con el antagonista BQ-610 mediante el análisis del área bajo la curva entre las 24hs y las 144hs (figura 16). \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal; †††  $p < 0,001$  vs DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h). Número de animales: 18-20 (controles), 7-10 (tratamiento BQ-610).

Analizando el área bajo la curva de los valores de PAS entre las 24hs y las 144hs, como una manera de observar el comportamiento general de este parámetro, determinamos que no hubo modificaciones entre los distintos grupos de animales Nt tratados y no tratados, los controles DOCA-sal tuvieron una PAS promedio a lo largo de esa semana de 169 mmHg y debido al tratamiento con el antagonista ET<sub>A</sub> se produjo una disminución de la PAS en ambos grupos hipertensos (Figura 17). Respecto de este último punto, las ratas DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) tuvieron una PAS promedio de 140 mmHg y las DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) de 129 mmHg (Figura 17).

Por otro lado, no encontramos diferencias significativas en la FC a lo largo de las 144hs de infusión de BQ-610 entre los distintos tratamientos, ya sea en animales Nt como hipertensos DOCA-sal (Figura 18). En este sentido, la inhibición crónica del receptor ET<sub>A</sub> tampoco produjo cambios en la FC debido a las diferentes dosis de BQ-610 aplicadas (Figura 18). Si analizamos el área bajo la curva de los datos de FC entre las 24hs y las 144hs observamos que los valores promedio a lo largo de esa semana estuvieron entre los  $350 \pm 2$  BPM y los  $364 \pm 3$  BPM (Figura 19). Estos valores están dentro del rango de FC considerado normal en las ratas Sprague-Dawley [365,366].



**Figura 18. Modulación de la frecuencia cardiaca durante el bloqueo crónico del receptor ET<sub>A</sub>.** Se grafican los valores de la FC (BPM) en función del tiempo desde las 24hs hasta las 144hs de infusión crónica del antagonista ET<sub>A</sub> (BQ-610). Los valores de FC durante las 48hs previas al tratamiento sirven de referencia del punto de partida de todos los grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos estudiados. Número de animales: 18-20 (controles), 7-10 (tratamiento BQ-610).



**Figura 19. Frecuencia cardiaca media durante el bloqueo crónico del receptor ET<sub>A</sub>.** Se describe el comportamiento general de la FC (BPM) durante el tratamiento con el antagonista BQ-610 mediante el análisis del área bajo la curva entre las 24hs y las 144hs (figura 18). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos estudiados. Número de animales: 18-20 (controles), 7-10 (tratamiento BQ-610).

Estos resultados sugieren que de alguna manera los receptores ET<sub>A</sub> centrales podrían modular en el largo plazo la PA, sin efectos importantes sobre la FC. Es importante destacar que esto ocurre de manera selectiva en los animales DOCA-sal, sin modificar el comportamiento de la PAS o la FC en las ratas Nt. Además, en los animales hipertensos los cambios observados parecen, al menos en parte, dependiente de la dosis de BQ-610.

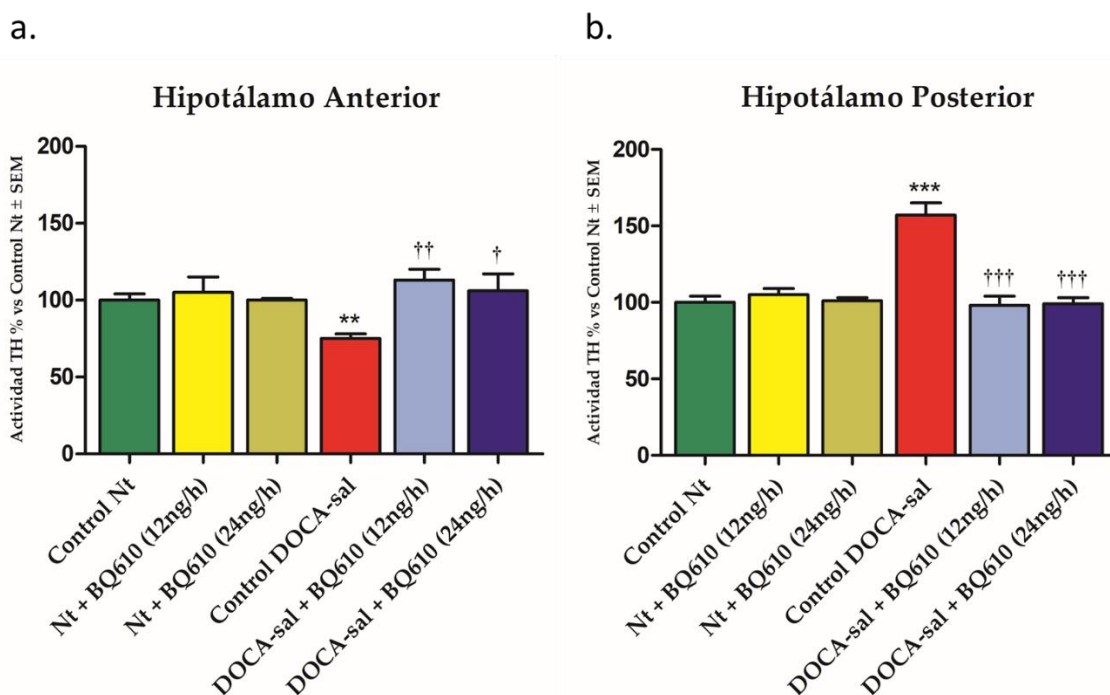
#### 4.1.2. Hipotálamo anterior y posterior.

Hemos destacado la importancia del hipotálamo en la regulación de la homeostasis de distintos parámetros fisiológicos. Además, resaltamos las características del HA y el HP como moduladores de la actividad simpática. En este sentido, mencionamos que el HA es una región simpatoinhibitoria mientras que el posterior simpatoexcitatoria. Elegimos estudiar estas áreas ya que uno de los objetivos del trabajo es evaluar las implicancias del receptor ET<sub>A</sub> en la interacción a largo plazo con el sistema catecolaminérgico central. Además, sabemos que el hipotálamo cumple un papel importante en la regulación central de la función cardiovascular, lo cual nos resulta de utilidad para evaluar su participación en este modelo de HTA sal dependiente.

#### 4.1.2.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.

Se estudió si el bloqueo de los receptores ET<sub>A</sub> centrales modifica el funcionamiento del sistema catecolaminérgico en el hipotálamo de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal. Se evaluaron los niveles de actividad de la TH en estas regiones del SNC mediante el ensayo radioenzimático descrito en Materiales y Métodos.

En el HA los resultados mostraron que no hubo cambios en la actividad de la TH en los distintos grupos de animales Nt, ya sea con o sin la administración de BQ-610 (Figura 20.a). Mientras que se encontró una disminución del 25% de la actividad enzimática en los controles DOCA-sal. Esta reducción se vio revertida debido a la inhibición crónica ET<sub>A</sub>, tanto para el grupo DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) como para el DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) (Figura 20.a).



**Figura 20. Efectos del bloqueo crónico ET<sub>A</sub> sobre la actividad de la TH en el hipotálamo anterior y posterior.** **a.** Se grafican los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el hipotálamo anterior de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el hipotálamo posterior. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 vs Control Nt; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001 vs Control DOCA-sal. Número de animales: 3-5.

Por otro lado, se observó un efecto opuesto en el HP. Si bien los resultados mostraron que no hubo cambios en la actividad de la TH en los distintos grupos de animales Nt (al igual que en el HA) (Figura 20.b), se encontró un aumento del 57% de la actividad enzimática en el HP de los controles DOCA-sal. Asimismo, este incremento se vio revertido por la

administración de BQ-610, tanto para dosis de 12ng/h como para dosis de 24ng/h (Figura 20.b).

Estos resultados muestran una actividad de la TH disminuida en el HA y aumentada en el HP de los animales DOCA-sal que, en ambos casos, la inhibición crónica del receptor ET<sub>A</sub> tiende a llevar estos valores a lo del control Nt. Estos datos sugieren que el sistema catecolaminérgico en el hipotálamo es modulado en el largo plazo a través de la participación del receptor ET<sub>A</sub>.

#### **4.1.2.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.**

Otra forma de estudiar si el bloqueo a largo plazo del receptor ET<sub>A</sub> modifica el funcionamiento del sistema catecolaminérgico (en particular de la TH) en el hipotálamo de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal es evaluar los niveles de expresión de esta enzima y su estado de fosforilación mediante WB. Estos experimentos fueron realizados en el HA y el HP por separado según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

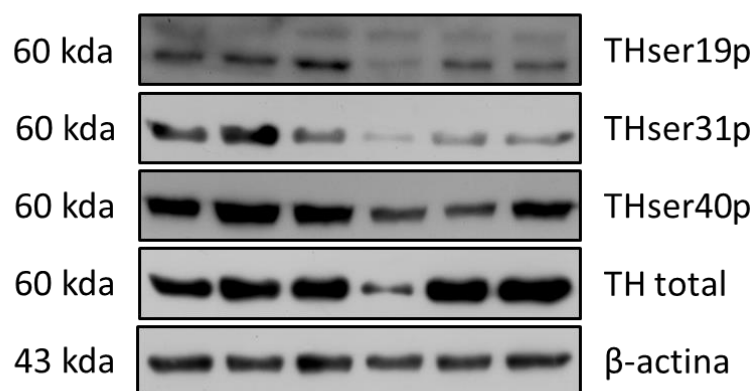
En el HA de los animales Nt, la administración de BQ-610 no produjo modificaciones en la expresión de TH total, así como tampoco en los niveles de fosforilación en Ser 19, 31 y 40 (Figura 21). Por su parte, los niveles totales de la enzima disminuyeron un 68% en los controles DOCA-sal. Esto se vio acompañado de un estado de fosforilación disminuido en todas las variantes analizadas. El tratamiento de los animales hipertensos con las diferentes dosis del antagonista revirtió la expresión de la TH total y de las variantes fosforiladas en Ser 19 y 40, sin que afecte a la Ser 31 (Figura 21).

Por otro lado, el HP los resultados mostraron que no hubo cambios en la expresión y fosforilación de la enzima en los controles Nt (Figura 22). Sin embargo, se encontró un aumento del 81% en los niveles totales de la TH en los controles DOCA-sal que se vio acompañado en el mismo sentido en los niveles de fosforilación de la enzima. La administración de BQ-610, tanto para la dosis de 12ng/h como para dosis de 24ng/h, también revirtió completamente el incremento de la TH total y de las diferentes variantes fosforiladas en los animales hipertensos (Figura 22).

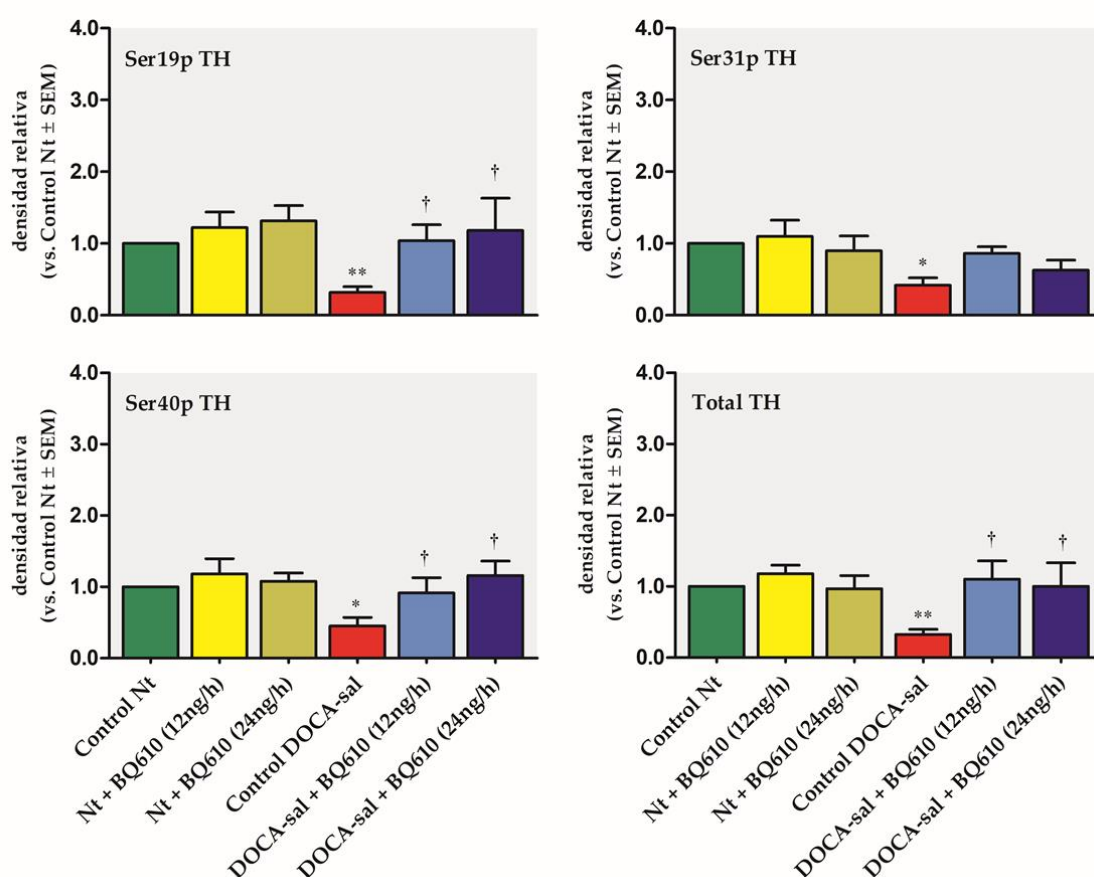
Estos resultados muestran una expresión de la TH disminuida en el HA y aumentada en el HP en los animales DOCA-sal, acompañada por cambios en el estado de fosforilación. Estas situaciones, se vieron contrarrestadas en ambas áreas por la inhibición crónica de los receptores ET<sub>A</sub> centrales. Esto apoya la idea que el sistema catecolaminérgico en esta región

se encuentra alterado en los animales DOCA-sal y se destaca que este mecanismo también se modula a el largo plazo a través de la regulación del receptor ET<sub>A</sub>.

a.

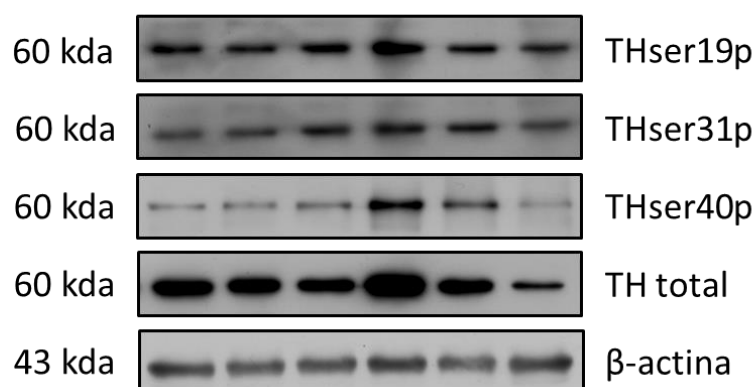


b.

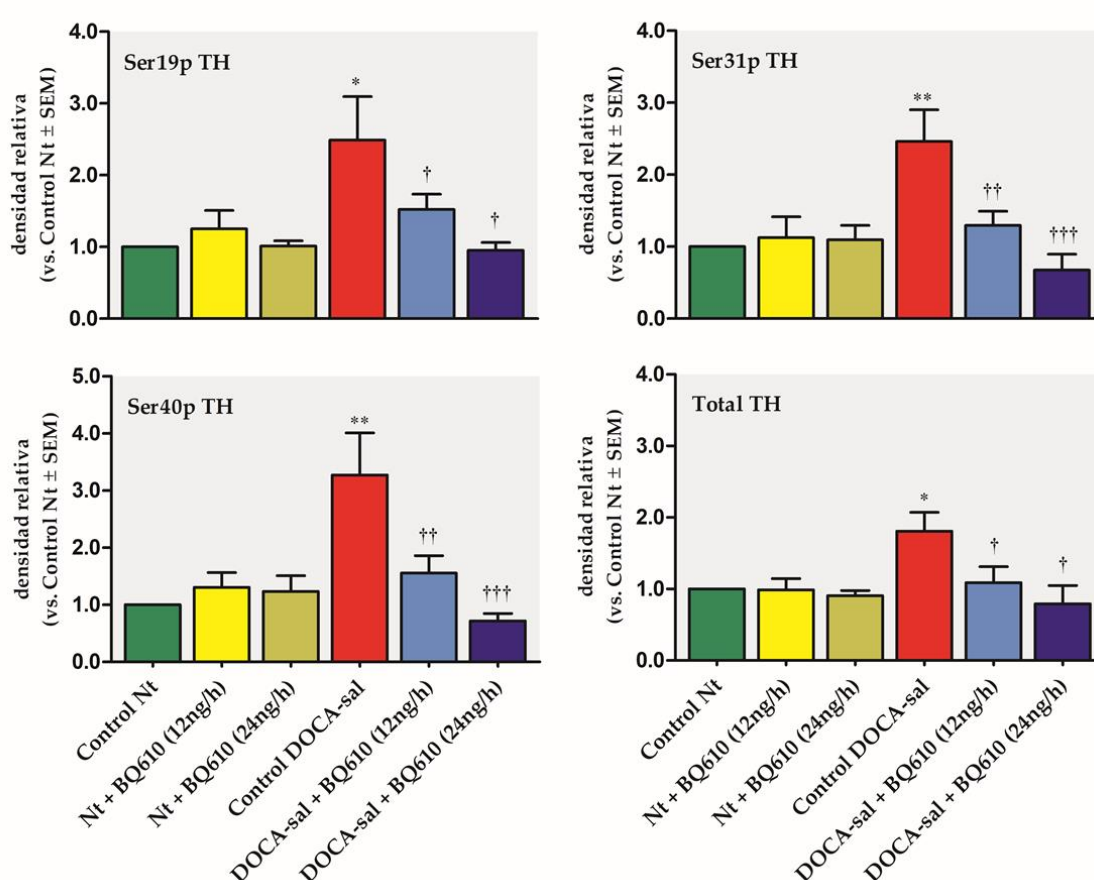


**Figura 21. Efectos del bloqueo crónico ET<sub>A</sub> sobre la fosforilación y expresión de la TH en el hipotálamo anterior.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el hipotálamo anterior. Se utilizó β-actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 vs Control Nt; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001 vs Control DOCA-sal. Número de animales: 4-7.

a.



b.



**Figura 22. Efectos del bloqueo crónico  $ET_A$  sobre la fosforilación y expresión de la TH en el hipotálamo posterior.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el hipotálamo posterior. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs Control Nt; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal. Número de animales: 4-7.

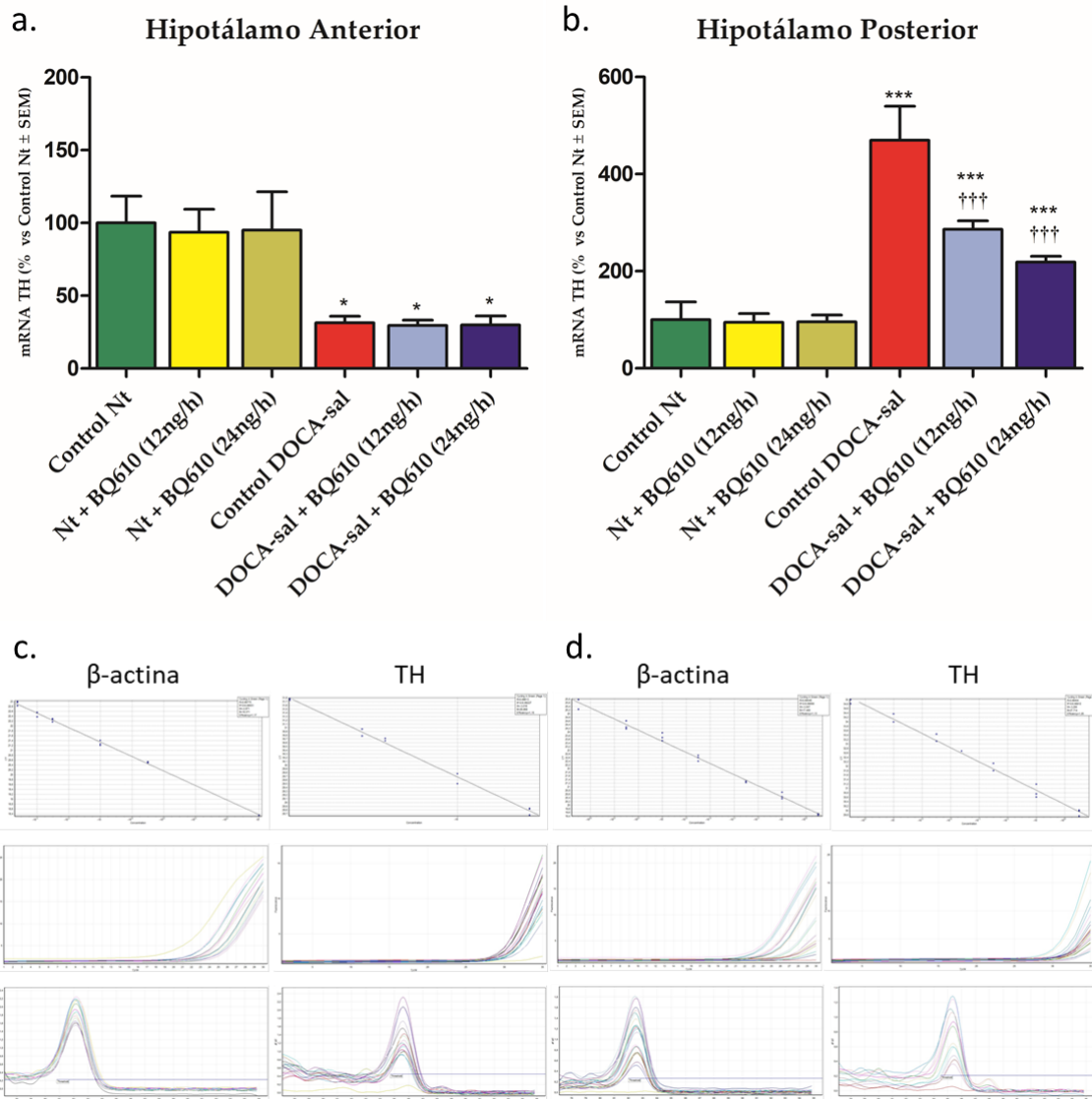
#### **4.1.2.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.**

Se evaluó si el bloqueo crónico del receptor ET<sub>A</sub> modifica la expresión del ARNm de la enzima en el hipotálamo de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal. Estos experimentos fueron realizados en el HA y el HP por separado, mediante RT-PCR en tiempo real según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que no hubo cambios en la expresión del ARNm de la TH en los animales Nt tratados y no tratados con BQ-610 (Figura 23.a). Sin embargo, se encontró una disminución del 69% en los controles DOCA-sal. Sin embargo, la inhibición a largo plazo del receptor ET<sub>A</sub> no modificó la expresión del mensajero en los grupos DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) y DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) manteniéndose en ambos casos un 70% por debajo respecto del Control Nt (Figura 23.a).

Por otro lado, el tratamiento con BQ-610 (12ng/h o 24ng/h) no modificó la expresión del ARNm de la TH en el HP de controles Nt (Figura 23.b). Sin embargo, en esta región hipotalámica se observó aumento del 370% en los animales DOCA-sal. El tratamiento de los animales hipertensos con BQ-610 indujo una marcada disminución de los niveles de ARNm de TH. Este efecto no fue una reversión completa dado que, a pesar de la disminución provocada por el tratamiento en ambos casos, la expresión del ARNm de la TH siguió siendo significativamente superior que la del Control Nt (186% y 118%; BQ-610 12ng/h o 24ng/h, respectivamente) (Figura 23.b).

Los resultados en el hipotálamo de las ratas DOCA-sal muestran niveles del ARNm de la TH disminuidos en la región anterior y aumentados en la posterior al ser comparados con los controles Nt. Además, no hubo efectos en el HA de los animales DOCA-sal debido al tratamiento con el antagonista ET<sub>A</sub>, pero si en el HP. En este último caso, la expresión del mensajero disminuyó parcialmente sin alcanzar los valores encontrados en los animales Nt. Estos resultados parecen indicar que los niveles del ARNm de la TH en el HP parecieran estar modulado en el largo plazo por el receptor ET<sub>A</sub>.



**Figura 23. Efectos del bloqueo crónico  $ET_A$  sobre la expresión del ARNm de la TH en el hipotálamo anterior y posterior.** **a.** Se grafican los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el hipotálamo anterior de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el hipotálamo posterior. **c y d.** Ejemplos de las rectas de calibración, el perfil del ciclado y la temperatura de melting tanto para  $\beta$ -actina como para la TH. **c.** Parámetros hipotálamo anterior. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -2,97 \cdot \log[\text{conc}] + 18,37$ ; eficiencia = 1,17;  $R^2 = 0,995$ . Recta de TH:  $CT = -3,02 \cdot \log[\text{conc}] + 26,67$ ; eficiencia = 1,15;  $R^2 = 0,992$ . **d.** Parámetros hipotálamo posterior. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -3,05 \cdot \log[\text{conc}] + 17,40$ ; eficiencia = 1,13;  $R^2 = 0,991$ . Recta de TH:  $CT = -3,20 \cdot \log[\text{conc}] + 27,71$ ; eficiencia = 1,05;  $R^2 = 0,988$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal. Número de animales: 4.

#### 4.1.3. Bulbos olfatorios.

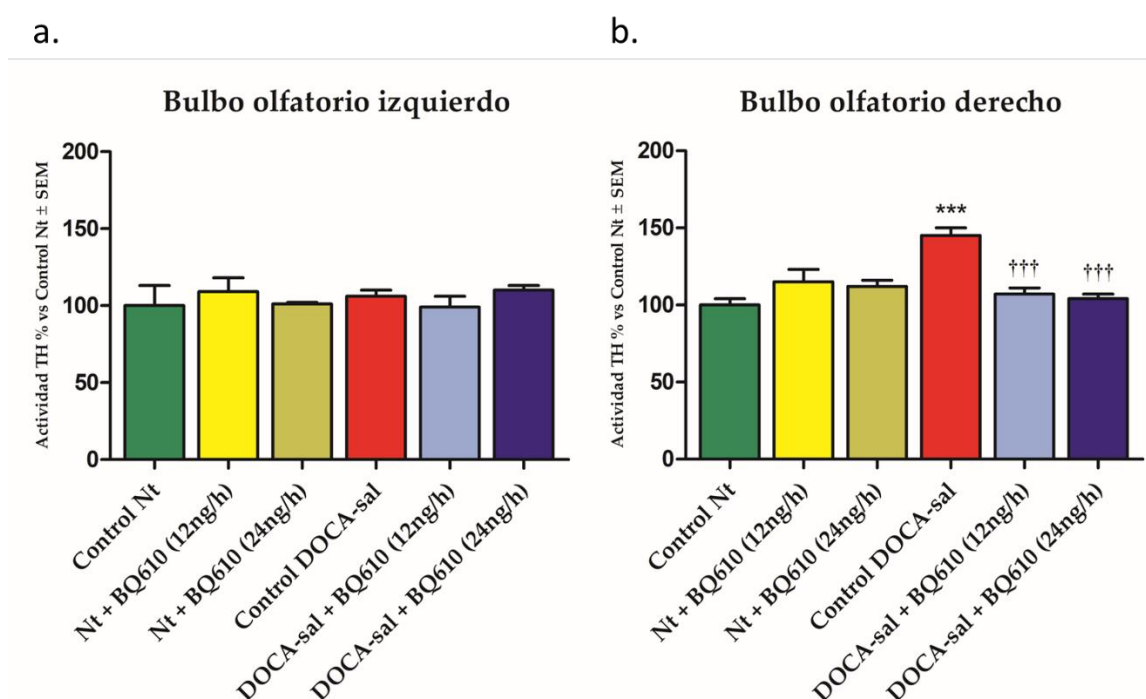
Existen pocos estudios que muestran la relación del BO con la regulación central de la función cardiovascular. Sin embargo, se comentaron diferentes trabajos que parecen vincularlos. Por otra parte, en trabajos previos mostramos que en esta región existe una

modulación de la actividad catecolaminérgica modulada por el sistema endotelinérgico [161,212,260,337].

Basado en estos antecedentes decidimos estudiar en el BO de ratas hipertensas DOCA-sal y la relación con la interacción entre el sistema catecolaminérgico y endotelinérgico central y la regulación de la función cardiovascular.

#### 4.1.3.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.

Al igual que en el hipotálamo, se estudió si el bloqueo a largo plazo de los receptores ET<sub>A</sub> centrales modifica el funcionamiento del sistema catecolaminérgico esta vez en el BO de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal. Se evaluó la actividad de la TH en el BO izquierdo y derecho por separado, mediante el ensayo radioenzimático descrito en Materiales y Métodos.



**Figura 24. Efectos del bloqueo crónico ET<sub>A</sub> sobre la actividad de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo y derecho.** **a.** Se grafican los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el bulbo olfatorio izquierdo de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el bulbo olfatorio derecho. \*\*\* p < 0,001 vs Control Nt; ††† p < 0,001 vs Control DOCA-sal. Número de animales: 3-5.

El bloqueo ET<sub>A</sub> no produjo cambios en la actividad de la TH en el BO izquierdo tanto de animales controles como hipertensos DOCA-sal (Figura 24.a), ni en el BO derecho de ratas Nt tratadas y no tratadas con BQ-610 (Figura 24.b). Sin embargo, en BO derecho controles DOCA-sal tuvieron un aumento de la actividad enzimática del 45% respecto del control Nt.

Este incremento se revirtió por administración de las diferentes dosis de BQ-610 estudiadas (12ng/h y 24ng/h) (Figura 24.b).

Estos resultados sugieren que en los animales DOCA-sal la actividad del sistema catecolaminérgico del BO derecho está aumentada y este estaría modulado por la administración crónica del antagonista del receptor ET<sub>A</sub>.

#### **4.1.3.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.**

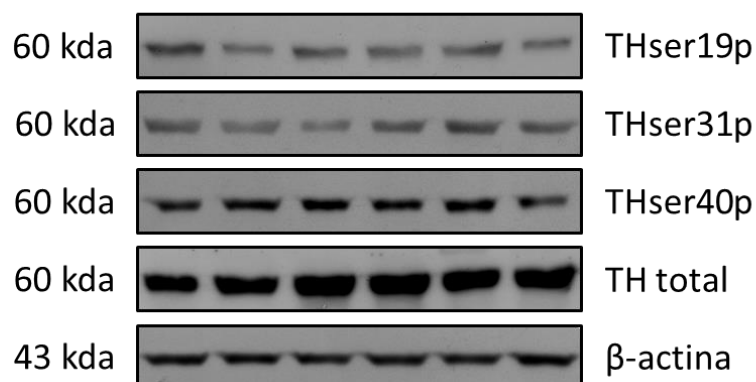
Se evaluaron los niveles de expresión de TH total y los niveles de fosforilación en el BO de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal para estudiar si el bloqueo a largo plazo de los receptores ET<sub>A</sub> centrales modifica este mecanismo de regulación de la biosíntesis de catecolaminas. Estos experimentos se realizaron en el BO izquierdo y derecho según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

En concordancia con lo observado respecto de la actividad de la TH en el BO izquierdo, el bloqueo a largo plazo del receptor ET<sub>A</sub> no modificó los niveles de expresión de TH total ni de la fosforilación de esta enzima en ninguno de los grupos estudiados (Figura 25).

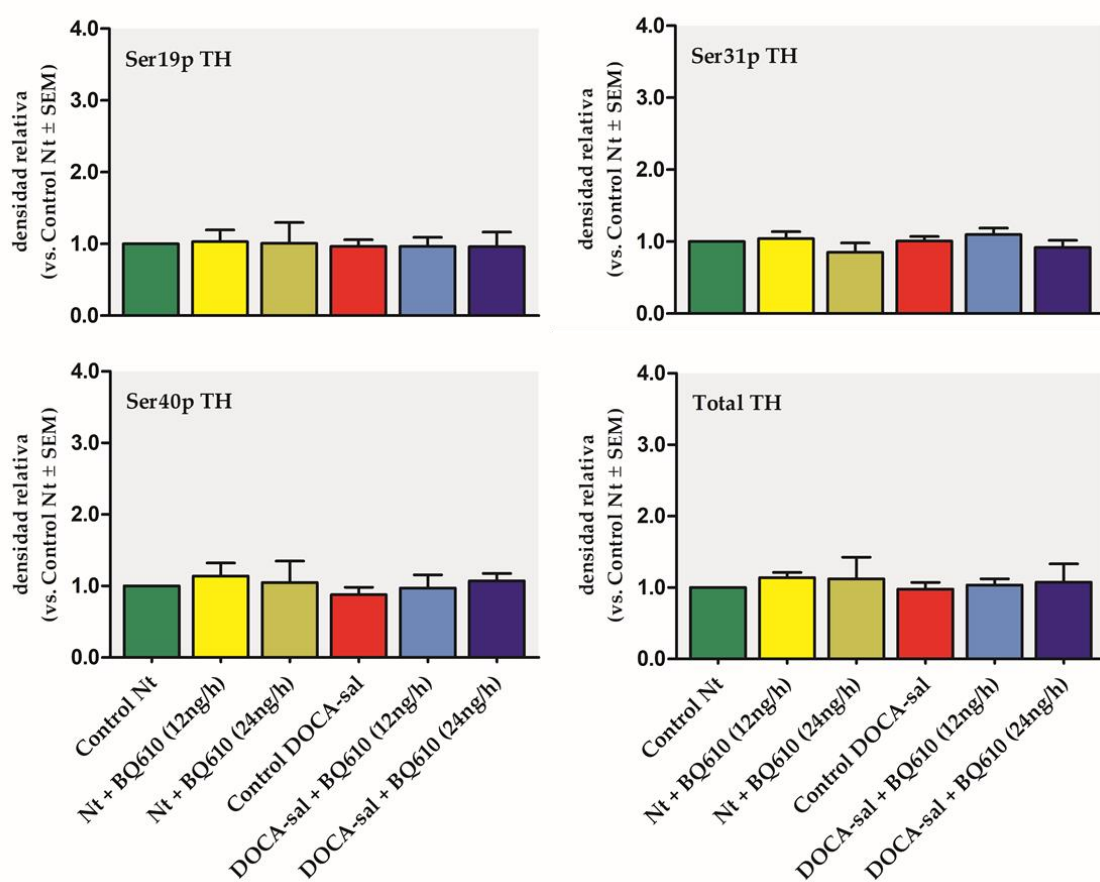
Por su parte, el BO derecho de los animales DOCA-sal fue el que presentó los cambios más importantes. Los controles hipertensos mostraron un aumento del 132% en los niveles totales de la TH. Asimismo, este incremento se vio acompañado en igual sentido por todos los sitios de fosforilación de la enzima estudiados, excepto los niveles de fosforilación de la serina 31 en los animales DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h). Allí, si bien se observa una tendencia hacia la disminución no resulta estadísticamente diferente respecto de su control hipertenso (Figura 26).

Por lo tanto, en el BO tenemos un aumento en la expresión de TH total en la hemiporción derecha de los animales DOCA-sal, que se acompaña por cambios similares en los diferentes niveles de fosforilación. Por su parte el BO izquierdo de los animales hipertensos no mostró cambios. Además, el bloqueo crónico ET<sub>A</sub> solo afectó a la hemiporción derecha, poniendo de manifiesto nuevamente el comportamiento asimétrico del BO. Asimismo, estos datos sugieren que la expresión y el estado de fosforilación de la TH (al menos en el BO derecho) se encontraría aumentada en los animales DOCA-sal y que la modulación a largo plazo de los receptores ET<sub>A</sub> centrales modifica este escenario.

a.

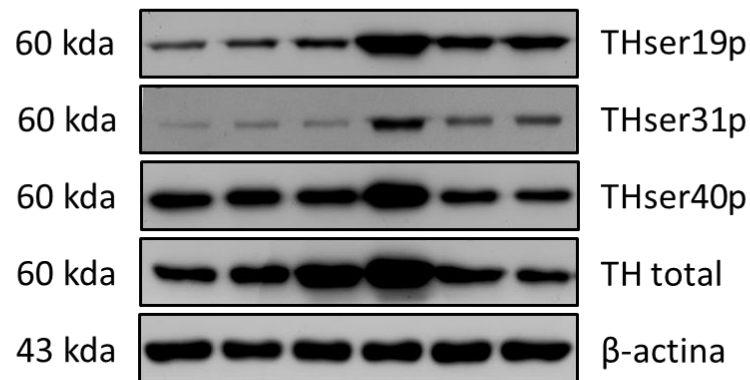


b.

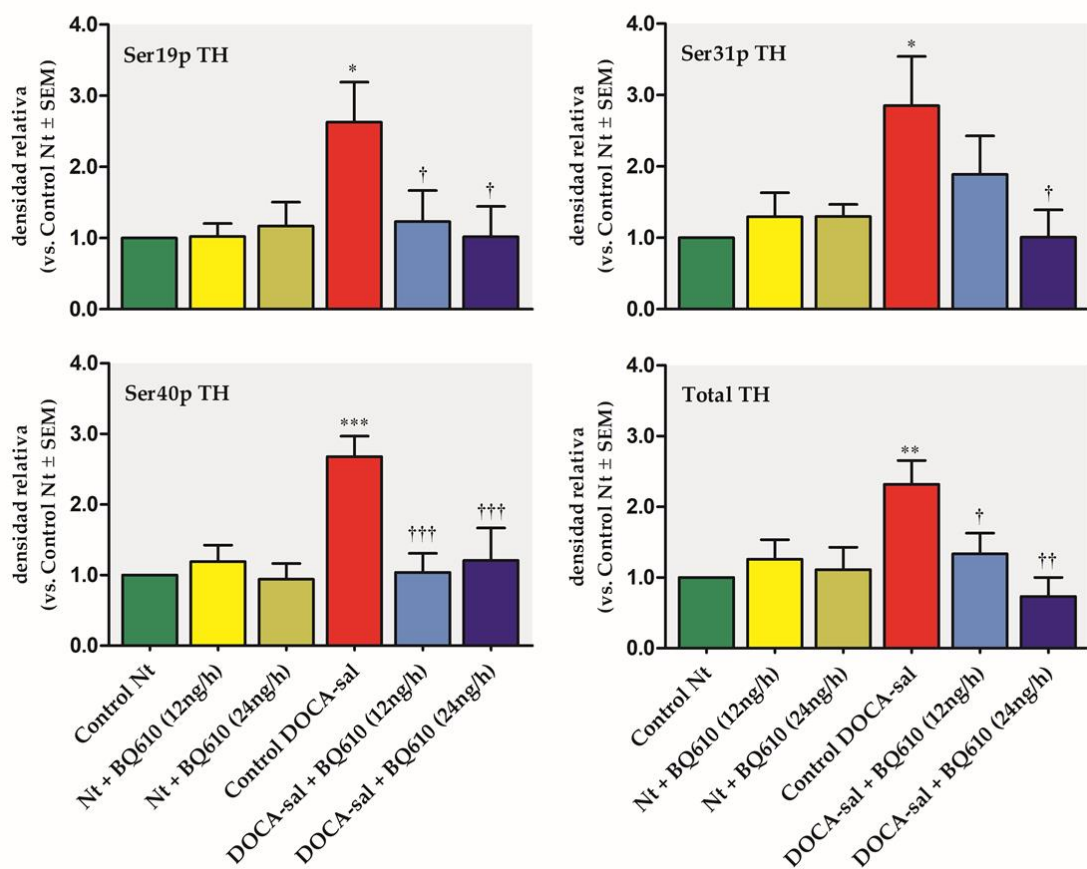


**Figura 25. Efectos del bloqueo crónico  $ET_A$  sobre la fosforilación y expresión de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). No se observaron diferencias significativas en las distintas fosforilaciones ni en la expresión total de la TH bajo ninguno de los tratamientos. Número de animales: 4-7.

a.



b.



**Figura 26. Efectos del bloqueo crónico  $ET_A$  sobre la fosforilación y expresión de la TH en el bulbo olfatorio derecho.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el bulbo olfatorio derecho. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal. Número de animales: 4-7.

#### **4.1.3.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.**

Se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para establecer si la inhibición a largo plazo de los receptores ET<sub>A</sub> centrales actúa sobre los niveles del ARNm de la TH en el BO izquierdo y derecho de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal.

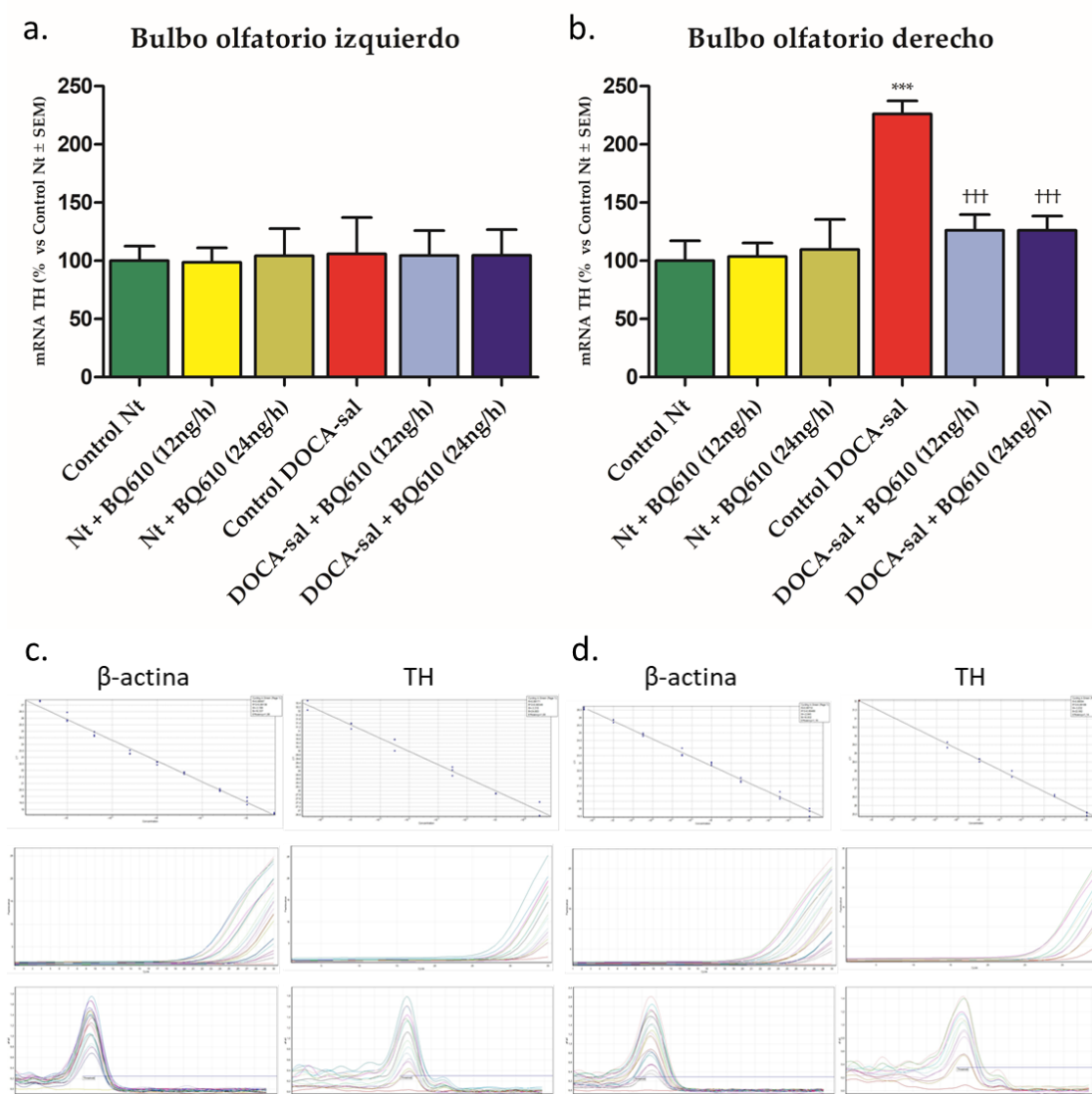
De la misma forma que en los experimentos de actividad y expresión de la TH, no hubo cambios en la expresión del ARNm de esta enzima en ninguno de los grupos evaluados en el BO izquierdo (Figura 27.a).

Por su parte, el tratamiento con BQ-610 (12ng/h o 24ng/h) no modificó la expresión del ARNm de la TH en el BO derecho de los animales Nt (Figura 27.b). No obstante, se encontró un 126% de aumento en los controles DOCA-sal, siendo este incremento revertido por administración de BQ-610, tanto para dosis de 12ng/h como para dosis de 24ng/h (Figura 27.b).

La expresión del ARNm de TH en el BO de las ratas DOCA-sal muestra valores aumentados en la hemiporción derecha, sin observarse cambios en la izquierda. El tratamiento con BQ-610 no modificó la expresión del mensajero en el BO izquierdo, pero si revirtió los valores encontrados en el derecho. Nuevamente se pone en evidencia el comportamiento asimétrico del BO. Estos resultados también manifiestan que, a nivel transcripcional, el sistema catecolaminérgico del BO derecho se encontraría alterado en los animales DOCA-sal y que la modulación a largo plazo del receptor ET<sub>A</sub> es capaz de modificar

esta

situación.



**Figura 27. Efectos del bloqueo crónico  $ET_A$  sobre la expresión del ARNm de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo y derecho.** **a.** Se grafican los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el bulbo olfatorio izquierdo de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el antagonista BQ-610 (dosis crónica: 12ng/h o 24ng/h) en el bulbo olfatorio derecho. **c y d.** Ejemplos de las rectas de calibración, el perfil del ciclado y la temperatura de melting tanto para  $\beta$ -actina como para la TH. **c.** Parámetros bulbo olfatorio izquierdo. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -3,19 \cdot \log[\text{conc}] + 16,34$ ; eficiencia = 1,06;  $R^2 = 0,991$ . Recta de TH:  $CT = -3,31 \cdot \log[\text{conc}] + 24,68$ ; eficiencia = 1,00;  $R^2 = 0,983$ . **d.** Parámetros bulbo olfatorio derecho. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -2,95 \cdot \log[\text{conc}] + 16,93$ ; eficiencia = 1,19;  $R^2 = 0,995$ . Recta de TH:  $CT = -3,03 \cdot \log[\text{conc}] + 22,56$ ; eficiencia = 1,14;  $R^2 = 0,992$ . \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; +++  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal. Número de animales: 4.

#### 4.1.4. Resumen: Bloqueo crónico del receptor $ET_A$ .

Los resultados de la inhibición central crónica del receptor  $ET_A$  en animales Nt y DOCA-sal conscientes se resumen en la tabla 10. Por un lado, podemos decir que este tratamiento no manifestó cambios observables en los parámetros hemodinámicos estudiados en los

animales Nt (Figuras 16-19). En estos grupos, tampoco se vio alterado el sistema catecolaminérgico en el hipotálamo o el BO debido al tratamiento (Figuras 20-27). Esto indicaría que el bloqueo  $ET_A$  no modifica el comportamiento de estos componentes, sugiriendo que este antagonista específico BQ-610 no tendría un efecto *per sé* sobre animales en condiciones fisiológicas normales.

En los controles DOCA-sal los registros hemodinámicos resultaron como era de esperar, encontrándose un significativo aumento de la PAS sin cambios en la FC (Figuras 16-19). En estos animales, el sistema catecolaminérgico respondió, en líneas generales tanto en el hipotálamo como en el BO, de manera acorde a lo observado en trabajos anteriores [161,162,337].

Por un lado, el HA mostró una reducción en la actividad de la TH en los animales hipertensos (Figura 20.a). Este efecto se vio respaldado por una menor expresión del ARNm, de la enzima y por un estado de fosforilación disminuido respecto del Control Nt (Figuras 21 y 23.a). Distinto fue el caso del HP que reveló un significativo aumento en la actividad enzimática, así como también en su expresión y fosforilación (Figuras 20.b y 22). Además, los niveles del ARNm también se vieron incrementados (Figura 23.b). Estos resultados en el hipotálamo de las ratas DOCA-sal muestran una menor activación de un área simpatoinhibitoria como el HA y una mayor activación de un área simpatoexcitatoria como el HP. En este contexto, el estado general del sistema catecolaminérgico en el hipotálamo favorecería un aumento de la descarga simpática en este modelo de HTA.

Por su parte, la inhibición crónica de los receptores  $ET_A$  centrales en los animales DOCA-sal produjo una reversión casi completa de los parámetros de la TH estudiados tanto en el HA como en el HP llegando a valores similares a los observados en los animales Nt (Figuras 20-23). Esta reversión tuvo como excepciones en el HA la fosforilación en la serina 31 (Figura 21) y los niveles del ARNm de la TH (Figura 23.a). Es importante destacar que lo observado debido al bloqueo  $ET_A$  a largo plazo en el HA difiere de lo advertido bajo el mismo tratamiento realizado de manera aguda, donde el antagonista  $ET_A$  no produjo modificaciones en esta área [337]. Los resultados sugieren que existe una fuerte influencia de los receptores  $ET_A$  centrales sobre la modulación a largo plazo del sistema catecolaminérgico del hipotálamo en condiciones patológicas como las del modelo DOCA-sal.

**EFFECTOS DEL BLOQUEO CRÓNICO DEL RECEPTOR ET<sub>A</sub>**

| Elementos estudiados >     | Parámetros Hemodinámicos |    | Regulación de la Tirosina hidroxilasa |                |                |                |                |                  |
|----------------------------|--------------------------|----|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| Tratamientos<br>v          | PAS                      | FC | Actividad                             | Expresión      | Fosforilación  |                |                | ARNm             |
|                            |                          |    |                                       |                | 19             | 31             | 40             |                  |
| HIPOTÁLAMO ANTERIOR        |                          |    |                                       |                |                |                |                |                  |
| Control Nt                 | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (12ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (24ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Control DOCA-sal           | ↑↑↑                      | ~  | ↓                                     | ↓              | ↓              | ↓              | ↓              | ↓↓↓              |
| DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) | ↓ <sub>D</sub>           | ~  | ↑ <sub>D</sub>                        | ↑ <sub>D</sub> | ↑ <sub>D</sub> | ~              | ↑ <sub>D</sub> | ↓↓↓              |
| DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) | ↓↓ <sub>D</sub>          | ~  | ↑ <sub>D</sub>                        | ↑ <sub>D</sub> | ↑ <sub>D</sub> | ~              | ↑ <sub>D</sub> | ↓↓↓              |
| HIPOTÁLAMO POSTERIOR       |                          |    |                                       |                |                |                |                |                  |
| Control Nt                 | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (12ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (24ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Control DOCA-sal           | ↑↑↑                      | ~  | ↑↑                                    | ↑              | ↑              | ↑              | ↑              | ↑↑↑              |
| DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) | ↓ <sub>D</sub>           | ~  | ↓↓ <sub>D</sub>                       | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓↓ <sub>D</sub>  |
| DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) | ↓↓ <sub>D</sub>          | ~  | ↓↓ <sub>D</sub>                       | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓↓ <sub>D</sub>  |
| BULBO OLFATORIO IZQUIERDO  |                          |    |                                       |                |                |                |                |                  |
| Control Nt                 | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (12ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (24ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Control DOCA-sal           | ↑↑↑                      | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) | ↓ <sub>D</sub>           | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) | ↓↓ <sub>D</sub>          | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| BULBO OLFATORIO DERECHO    |                          |    |                                       |                |                |                |                |                  |
| Control Nt                 | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (12ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Nt + BQ-610 (24ng/h)       | ~                        | ~  | ~                                     | ~              | ~              | ~              | ~              | ~                |
| Control DOCA-sal           | ↑↑↑                      | ~  | ↑↑                                    | ↑              | ↑              | ↑              | ↑              | ↑↑↑              |
| DOCA-sal + BQ-610 (12ng/h) | ↓ <sub>D</sub>           | ~  | ↓↓ <sub>D</sub>                       | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ~              | ↓ <sub>D</sub> | ↓↓↓ <sub>D</sub> |
| DOCA-sal + BQ-610 (24ng/h) | ↓↓ <sub>D</sub>          | ~  | ↓↓ <sub>D</sub>                       | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓ <sub>D</sub> | ↓↓↓ <sub>D</sub> |

**Tabla 10. Resumen de los efectos del bloqueo crónico del receptor ET<sub>A</sub>.** Se describen los cambios producidos debido al tratamiento a largo plazo con BQ-610 en el HA, HP, BO izquierdo y derecho de los animales Nt y DOCA-sal. Los factores estudiados son representados indicando si no hubo diferencias significativas respecto del Control Nt (~) o bien, si se produjeron aumentos (↑) o disminuciones (↓). La cantidad de flechas dan una idea de la amplitud del cambio observado y el subíndice D indica que la comparación es versus el Control DOCA-sal.

Por otro lado, el BO de los animales hipertensos mostró una respuesta asimétrica, siendo la hemiporción derecha la que presentó grandes cambios, sin observarse variaciones importantes en la izquierda. En el BO derecho se observó un aumento de todas las variables estudiadas respecto de la regulación de la TH. El tratamiento con el antagonista ET<sub>A</sub> revirtió este escenario a niveles similares a los hallados en los animales Nt (Figuras 24-27). Esta respuesta asimétrica sugiere una fuerte participación de los receptores ET<sub>A</sub> centrales sobre la modulación del sistema catecolaminérgico en el BO derecho en el modelo DOCA-sal.

Además, esto insinúa que esta área podría cumplir un papel importante en los efectos observados en los animales hipertensos.

Conjuntamente, los efectos centrales observados en los animales hipertensos debido a la infusión crónica de BQ-610 fueron acompañados de modificaciones en la PAS (Figuras 16 y 17). Los animales tratados durante 7 días con 12ng/h del antagonista ET<sub>A</sub> mostraron una clara, sostenida y significativa disminución de la PAS. Además, estos valores decrecieron aún más al duplicarse la dosis (Figuras 16 y 17). En conjunto, estos hallazgos indicarían que los efectos centrales del bloqueo de los receptores ET<sub>A</sub> repercuten en el mantenimiento de la PAS aumentada en el modelo DOCA-sal.

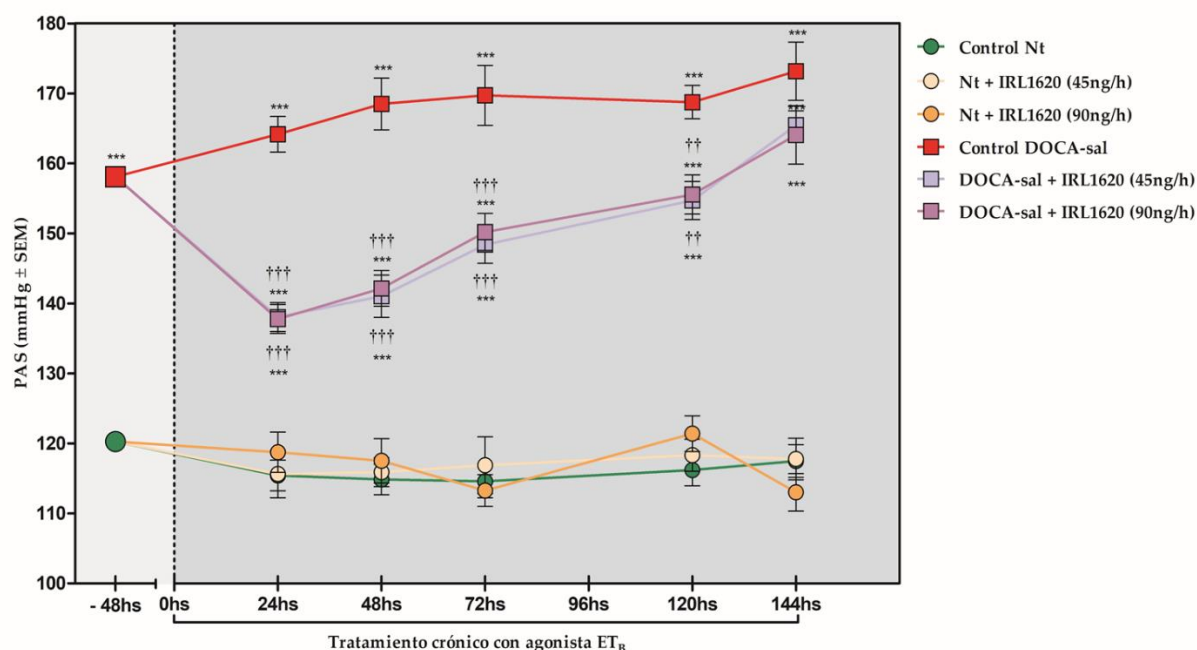
## **4.2. Activación crónica del receptor ET<sub>B</sub>.**

Basado en los resultados obtenidos inhibiendo el receptor ET<sub>A</sub>, pensamos que la ETs endógenas pueden estar siendo desplazadas hacia el receptor ET<sub>B</sub> y este efecto podría estar justificando los resultados encontrados hasta aquí. De esta manera y con el objeto de responder esta hipótesis fue que se estudió los efectos de la activación ET<sub>B</sub> sobre la modulación a largo plazo de la transmisión noradrenérgica y el papel de esta interacción en el desarrollo y mantenimiento de la HTA en el modelo DOCA-sal. Así, se realizó la activación crónica ET<sub>B</sub> (IRL1620) a nivel central durante 7 días y se evaluó la respuesta del sistema catecolaminérgico en el HA, HP, BO izquierdo y BO derecho. De igual manera que en los experimentos de inhibición ET<sub>A</sub>, se determinó la expresión, fosforilación y actividad de la TH, así como también los niveles de su ARNm. Además, se analizaron los efectos de la activación ET<sub>B</sub> sobre la PAS y la FC tanto en animales Nt como DOCA-sal.

### **4.2.1. Parámetros hemodinámicos.**

Se tomaron registros de la PAS y la FC entre las 24hs y las 144hs de activación crónica de los receptores ET<sub>B</sub>. Se usaron como referencia los valores de PAS previo a la administración de IRL1620 (Figura 28. - 48hs, círculo verde para los Nt, círculo rojo para los DOCA-sal). En las ratas Nt no se encontraron diferencias significativas a lo largo de las 144hs debido al tratamiento con el agonista (45ng/h o 90ng/h) (Figura 28). Además, como se describió anteriormente en los resultados de inhibición ET<sub>A</sub>, los controles DOCA-sal continuaron incrementando su PAS a lo largo de la semana alcanzando un máximo de 173 mmHg a las 144hs (Figura 28).

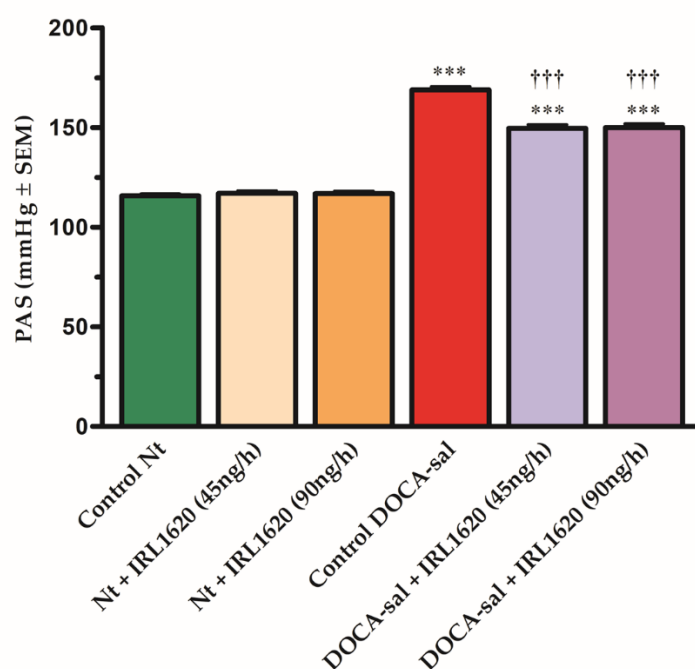
La activación crónica del receptor  $ET_B$  produjo una importante disminución de la PAS en los animales hipertensos. En las ratas DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h) esta reducción fue más acentuada durante las primeras 48hs, alcanzando un mínimo de 138 mmHg (a las 24hs) y finalizando el tratamiento en 165 mmHg (Figura 28). La intensidad del efecto no se modificó sustancialmente al administrarse el doble de la dosis de IRL1620 (90ng/h). De esta manera no se encontraron diferencias significativas con el grupo anterior. Es así como los animales DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h) alcanzaron una PAS mínima también de 138 mmHg a las 24hs y finalizaron las 144hs de infusión en 164 mmHg (Figura 28).



**Figura 28. Modulación de la presión arterial sistólica debido a la activación crónica del receptor  $ET_B$ .** Se grafican los valores de la PAS (mmHg) en función del tiempo desde las 24hs hasta las 144hs de infusión crónica del agonista  $ET_B$  (IRL1620). Los valores de PAS durante las 48hs previas al tratamiento sirven de referencia del punto de partida de todos los grupos experimentales. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; ††  $p < 0,01$ ; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal. Número de animales: 18-20 (controles), 8-10 (tratamiento IRL1620).

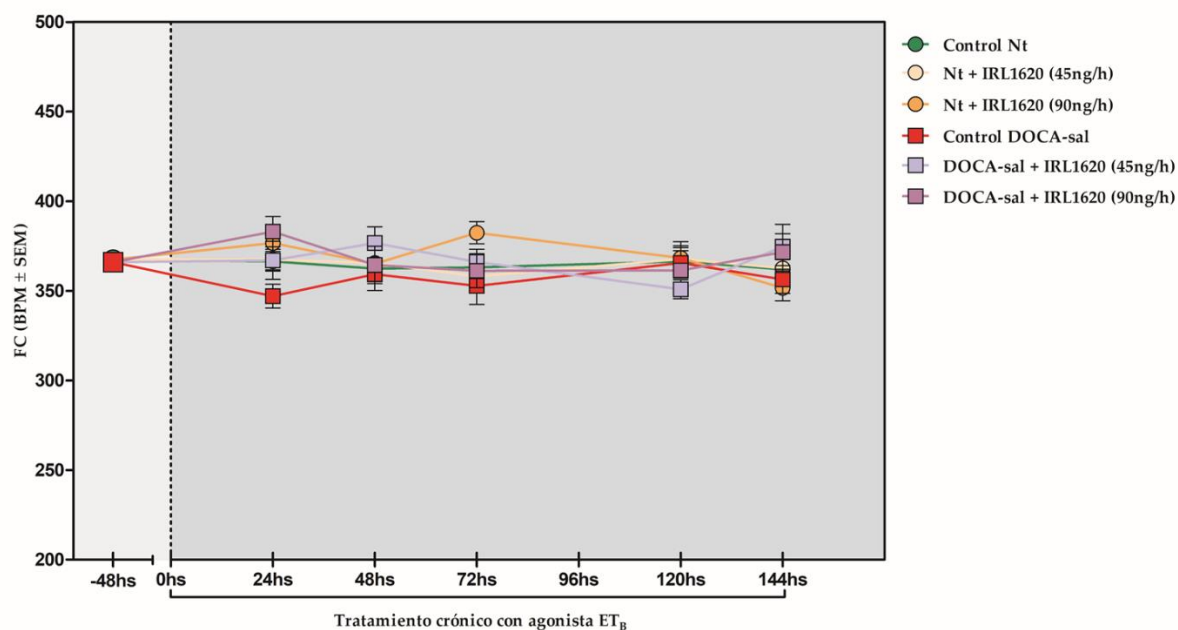
Analizando el área bajo la curva de los valores de PAS entre las 24hs y las 144hs, como una manera de ver el comportamiento general de este parámetro, observamos que no hubo modificaciones importantes entre los distintos grupos de animales Nt. Por su parte, los controles DOCA-sal tuvieron una PAS promedio a lo largo de esa semana de 169 mmHg y debido al tratamiento con el agonista  $ET_B$  se produjo una disminución de la PAS en ambos grupos hipertensos tratados (Figura 29). Respecto de este último punto, las ratas DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h) tuvieron una PAS promedio de 150 mmHg al igual que las DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h). Por lo tanto, el comportamiento general de la PAS durante la semana de tratamiento mostró una disminución de 19 mmHg en ambos grupos hipertensos que

recibieron el tratamiento comparados con el Control DOCA-sal (Figura 29). No obstante, se encontraron algunas diferencias respecto de lo observado durante el bloqueo crónico  $ET_A$ . Por un lado, el IRL1620 produjo un descenso menor de la PAS durante toda la semana en comparación con la inhibición con BQ-610. Además, durante la activación  $ET_B$ , estas disminuciones fueron a lo largo del tiempo cada vez más pequeñas, llegando a los últimos días de tratamiento con valores similares a los del Control DOCA-sal. Por otro lado, cabe remarcar que no hubo diferencias en la amplitud de la reducción de la PAS entre los dos grupos hipertensos tratados, por lo que en principio no habría en este caso una dependencia de la dosis (Figuras 28 y 29).

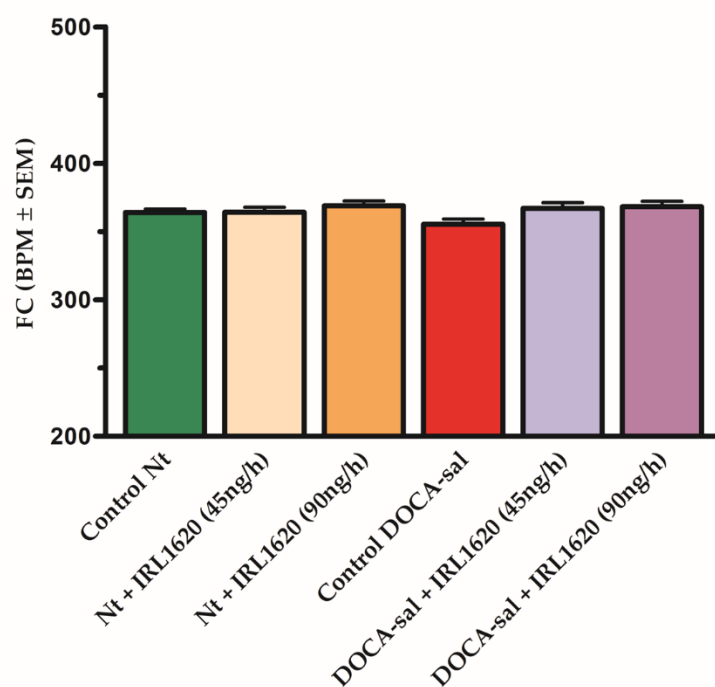


**Figura 29. Presión arterial sistólica media durante la activación crónica del receptor  $ET_B$ .** Se describe el comportamiento general de la PAS (mmHg) durante el tratamiento con el agonista IRL1620 mediante el análisis del área bajo la curva entre las 24hs y las 144hs (figura 28). \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt; †††  $p < 0,001$  vs Control DOCA-sal. Número de animales: 18-20 (controles), 8-10 (tratamiento IRL1620).

En cuanto a la FC, no se encontraron diferencias significativas a lo largo de las 144hs de activación  $ET_B$  entre los distintos tratamientos, ya sea en animales Nt como hipertensos DOCA-sal (Figura 30). Asimismo, la activación crónica del receptor  $ET_B$  tampoco produjo cambios en la FC debido a las distintas dosis de IRL1620 aplicadas (Figura 30). Analizando el área bajo la curva de los datos de FC entre las 24hs y las 144hs los valores promedio estuvieron entre los  $356 \pm 4$  BPM y los  $369 \pm 4$  BPM (Figura 31), estando dentro del rango de normalidad para las ratas Sprague-Dawley [365,366]. Al igual que mediante el bloqueo  $ET_A$ , la activación  $ET_B$  a largo plazo no afecta el comportamiento de la FC.



**Figura 30. Modulación de la frecuencia cardíaca durante la activación crónica del receptor  $ET_B$ .** Se grafican los valores de la FC (BPM) en función del tiempo desde las 24hs hasta las 144hs de infusión crónica del agonista  $ET_B$  (IRL1620). Los valores de FC durante las 48hs previas al tratamiento sirven de referencia del punto de partida de todos los grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos estudiados. Número de animales: 18-20 (controles), 8-10 (tratamiento IRL1620).



**Figura 31. Frecuencia cardíaca media durante la activación crónica del receptor  $ET_B$ .** Se describe el comportamiento general de la FC (BPM) durante el tratamiento con el agonista IRL1620 mediante el análisis del área bajo la curva entre las 24hs y las 144hs (figura 30). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos estudiados. Número de animales: 18-20 (controles), 8-10 (tratamiento IRL1620).

En resumen, los datos hemodinámicos sugieren que de alguna manera los receptores ET<sub>B</sub> centrales pueden modular en el largo plazo la PAS, sin consecuencias sobre la FC. Sin embargo, esto ocurre de una forma menos marcada que lo observado mediante el bloqueo crónico de los receptores ET<sub>A</sub>. Aquí también los efectos ocurren de manera selectiva en los animales DOCA-sal, sin modificar el comportamiento de la PAS o la FC en las ratas Nt. Por lo que, en su conjunto el sistema endotelinérgico central pareciera estar implicado en el mantenimiento a largo plazo de la PA en este modelo de hipertensión.

#### **4.2.2. Hipotálamo anterior y posterior.**

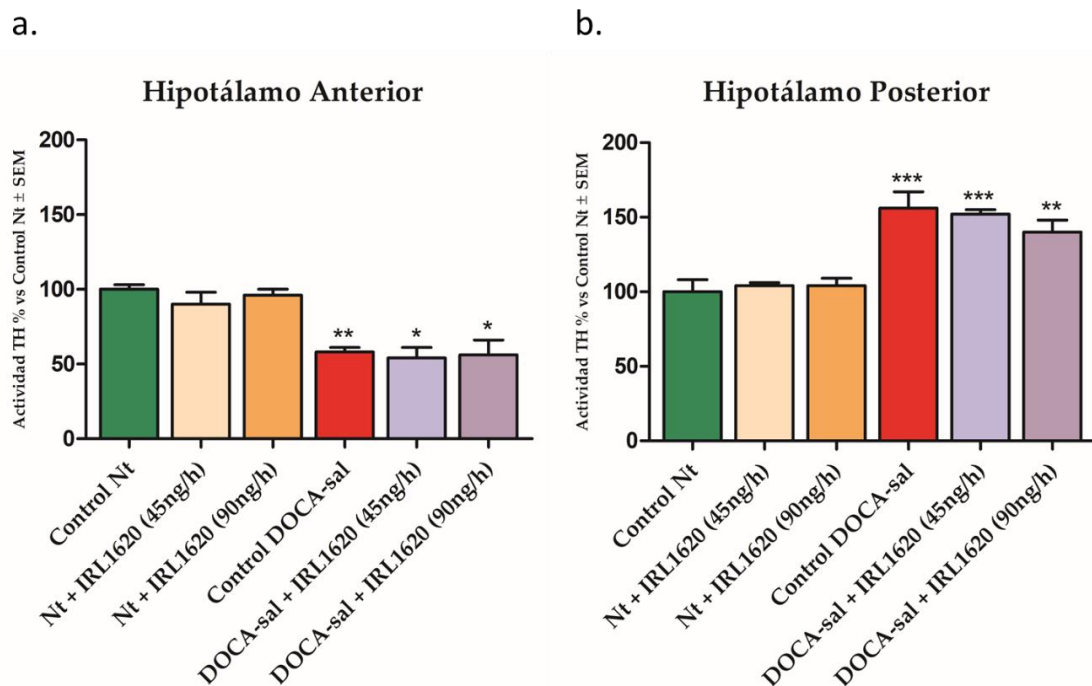
##### **4.2.2.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.**

Con el objetivo de estudiar los efectos de la activación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales sobre el sistema catecolaminérgico se evaluó la actividad de TH. Al igual que durante el bloqueo crónico ET<sub>A</sub>, estos experimentos fueron realizados en el HA y el HP de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal, mediante el ensayo radioenzimático descrito en Materiales y Métodos.

No hubo cambios en la actividad de la TH en el HA de los distintos grupos de animales Nt, ya sea con o sin la administración de IRL1620 (Figura 32.a). Por el contrario, se encontró una disminución del 42% de la actividad enzimática en los controles DOCA-sal. Esta reducción no se modificó debido a la activación crónica ET<sub>B</sub>. Tanto para el grupo DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h) como para el DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h) la actividad de la TH se mantuvo un 46% y 44% por debajo de los controles Nt, respectivamente (Figura 32.a).

Al igual que en el HA, no hubo cambios en la actividad de la TH en el HP de los distintos grupos de animales Nt. En cambio, se encontró un aumento del 56% de la actividad enzimática en las ratas controles DOCA-sal (Figura 32.b). La administración crónica de IRL1620 en cualquiera de sus dosis no modificó estos valores en los animales hipertensos. El incremento respecto del Control Nt fue de 52% y 40% respectivamente (Figura 32.b).

Estos resultados muestran que la actividad de la TH está disminuida en el HA y aumentada en el HP de los animales hipertensos. De manera preliminar, estos resultados sugieren que el agonista ET<sub>B</sub> no ejercerían efecto alguno en el largo plazo sobre la modulación de la actividad de la TH en animales normotensos e hipertensos DOCA-sal.



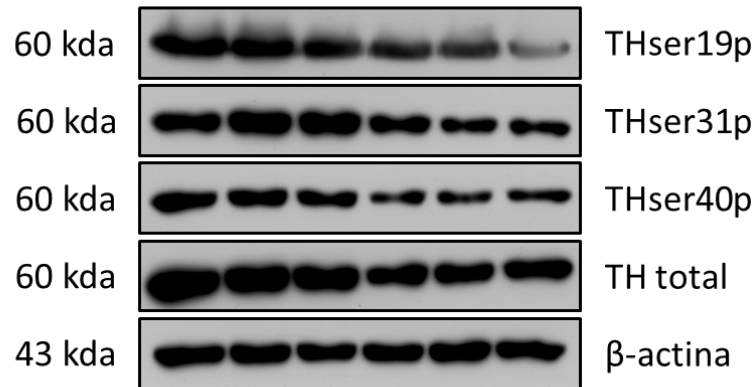
**Figura 32. Efectos de la activación crónica  $ET_B$  sobre la actividad de la TH en el hipotálamo anterior y posterior.** **a.** Se grafican los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el hipotálamo anterior de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el hipotálamo posterior. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt. Número de animales: 3-5.

#### 4.2.2.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.

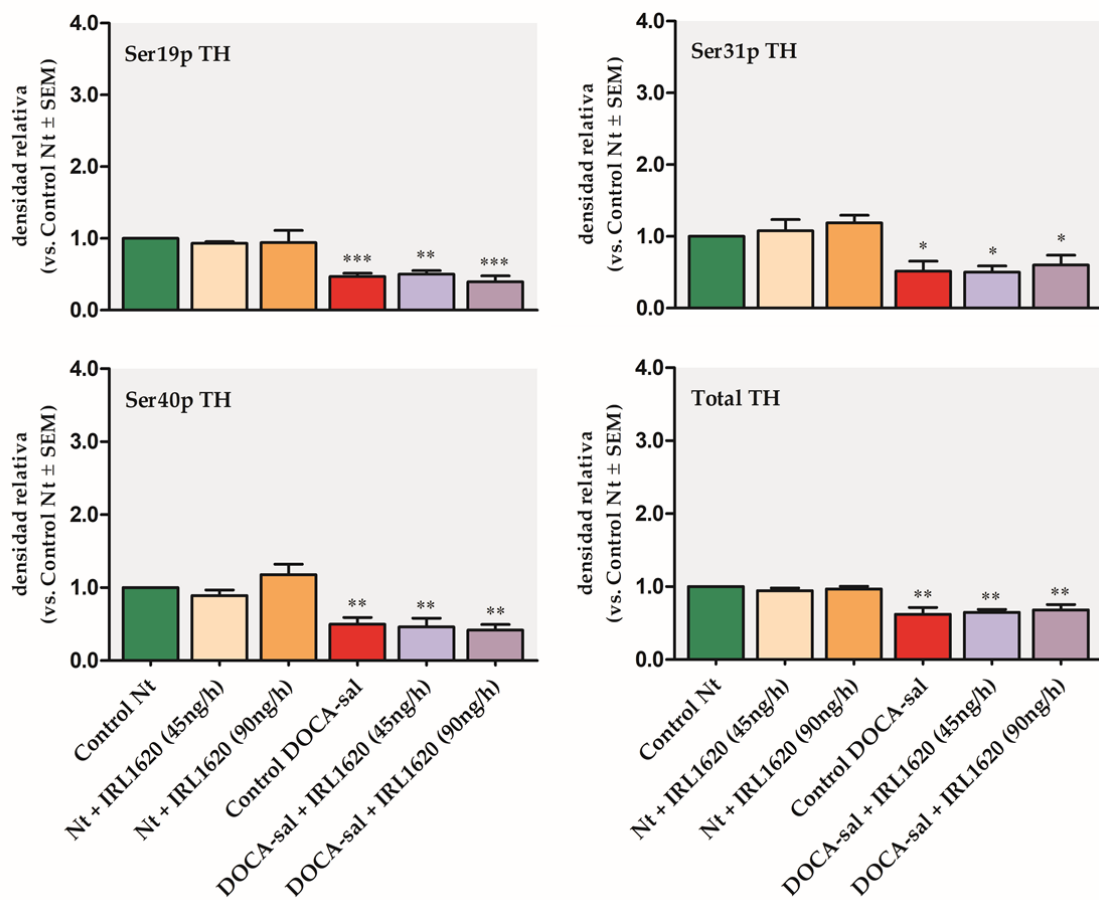
Se evaluaron los niveles de expresión y el estado de fosforilación de la TH mediante WB, para estudiar si la activación a largo plazo del receptor  $ET_B$  modifica este mecanismo regulador del sistema catecolaminérgico. Esto se determinó en el HA y el HP de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal, siguiendo el protocolo de WB descrito en Materiales y Métodos.

La administración de IRL1620 en el HA de los animales Nt no alteró los niveles de expresión de la TH total, así como tampoco sus distintas formas fosforiladas (Figura 33). En cambio, los niveles totales de la enzima disminuyeron un 38% en los controles DOCA-sal. Esto fue acompañado en el mismo sentido por todas las variantes fosforiladas de TH analizadas. Además, la activación crónica  $ET_B$ , no indujo cambios en los grupos DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h) y DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h), al ser comparados con los controles Nt (Figura 33).

a.

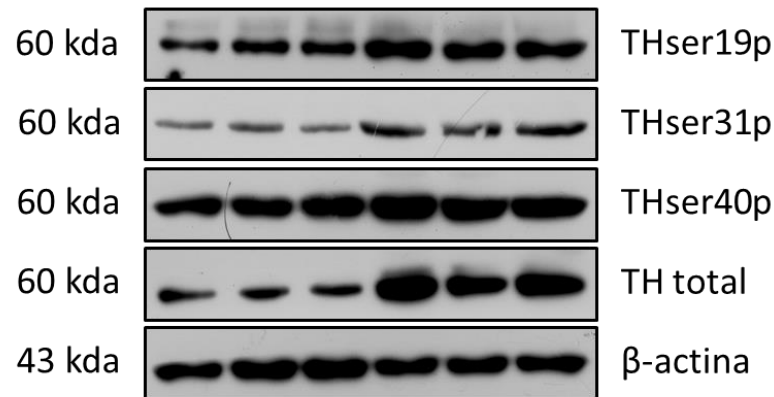


b.

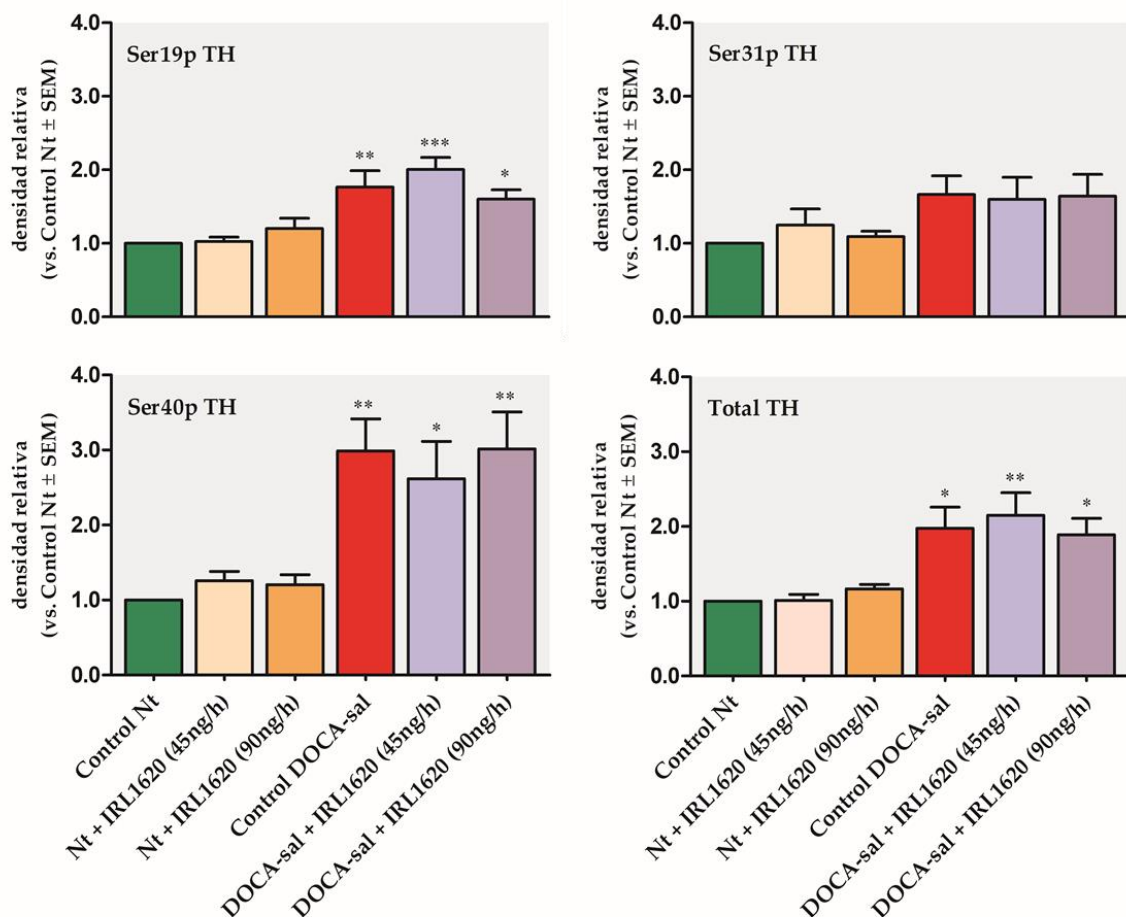


**Figura 33. Efectos de la activación crónica ET<sub>B</sub> sobre la fosforilación y expresión de la TH en el hipotálamo anterior.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el hipotálamo anterior. Se utilizó β-actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 vs Control Nt. Número de animales: 5.

a.



b.



**Figura 34. Efectos de la activación crónica ET<sub>B</sub> sobre la fosforilación y expresión de la TH en el hipotálamo posterior.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el hipotálamo posterior. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control Nt. Número de animales: 5.

Por otro lado, los resultados en el HP también mostraron que el agonista ET<sub>B</sub> no modificó la expresión y fosforilación de la enzima en los distintos grupos de animales Nt

(Figura 34). Sin embargo, de manera opuesta a lo observado en el HA, se encontró un aumento del 97% en los niveles totales de la TH en los controles DOCA-sal. Por su parte, la fosforilación en serinas 19 y 40 se incrementaron, en tanto la serina 31 no se modificó. Por su parte, la administración de IRL1620 en los animales DOCA-sal (45ng/h o 90ng/h), no modificó este patrón (Figura 34).

Estos resultados muestran una expresión de la TH disminuida en el HA y aumentada en el HP de los animales DOCA-sal, acompañada por cambios acordes en el estado de fosforilación. El tratamiento a largo plazo con el agonista ET<sub>B</sub> no alteró este comportamiento en los animales hipertensos. Estos datos sugieren que el agonista ET<sub>B</sub> no ejercería efecto alguno en el largo plazo sobre la regulación de la expresión y fosforilación de TH en animales normotensos, así como tampoco en el modelo DOCA-sal.

#### **4.2.2.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.**

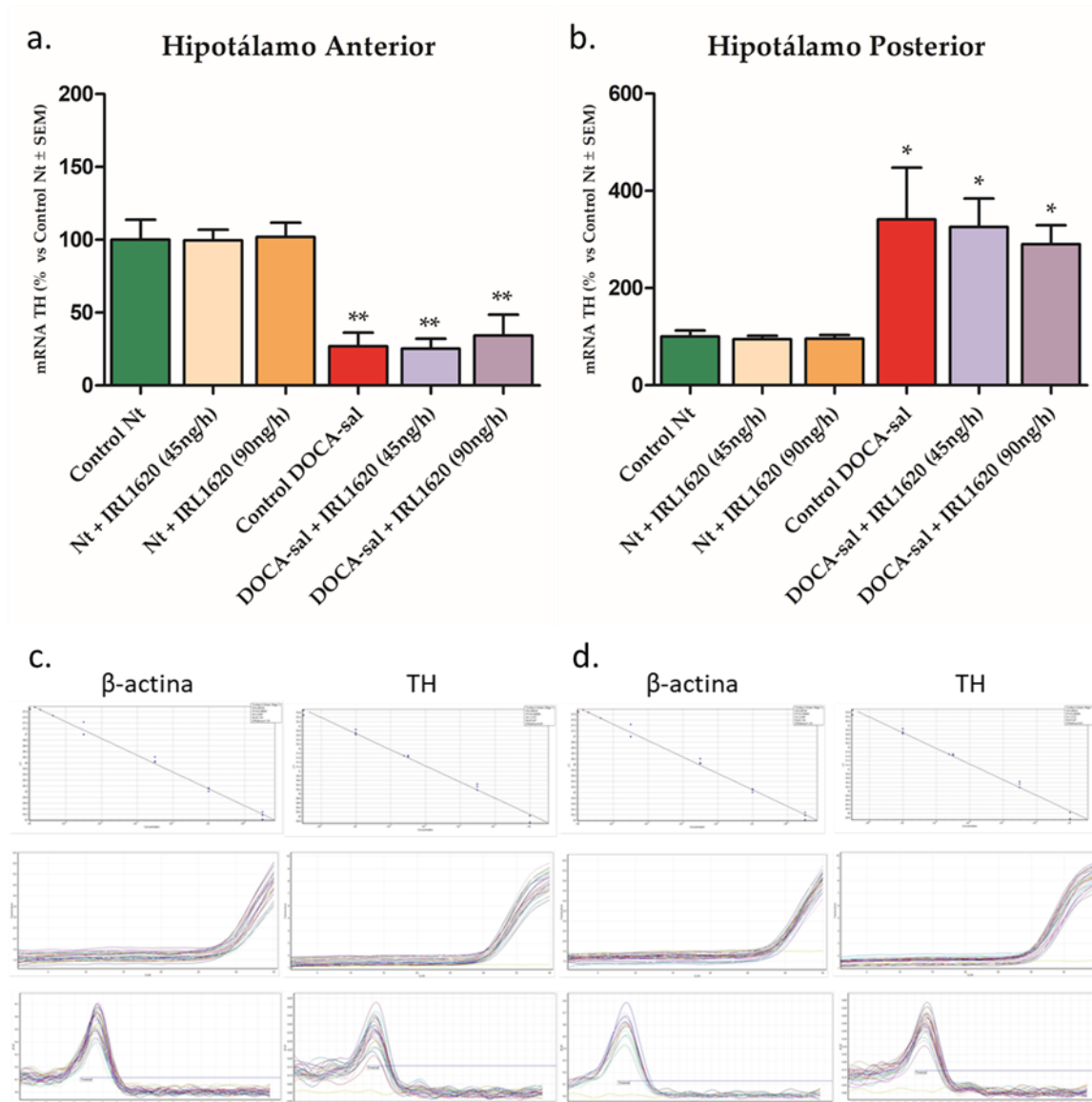
Se evaluó si la activación crónica del receptor ET<sub>B</sub> es capaz de modificar la expresión del ARNm de la TH en el hipotálamo de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal. Estos experimentos fueron realizados en el HA y el HP mediante RT-PCR en tiempo real según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que no hubo cambios en la expresión del ARNm de la TH en los animales Nt tratados con IRL1620 al ser comparados con los controles Nt (Figura 35.a). Sin embargo, se encontró una disminución del 73% en los controles DOCA-sal. Al igual que en los experimentos anteriores, la activación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales no modificó la expresión del mensajero en los grupos DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h) y DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h), manteniéndose ambos en un 75% y 66% por debajo del Control Nt, respectivamente (Figura 35.a).

Por otro lado, el tratamiento con IRL1620 (45ng/h o 90ng/h) no modificó la expresión del ARNm de la TH en el HP de los animales Nt al ser comparado con su control (Figura 35.b). Además, se encontró un 241% de aumento en los controles DOCA-sal, y al igual que en el HA de estos animales, los tratamientos con el agonista ET<sub>B</sub> no modificaron este parámetro (Figura 35.b).

De esta manera, la expresión del ARNm de la TH en el hipotálamo de las ratas DOCA-estuvo disminuida en la región anterior y aumentada en la posterior al ser comparados en cada caso con los controles Nt. Al mismo tiempo, no hubo efectos debido al tratamiento con el agonista ET<sub>B</sub> en ambas regiones hipotalámicas de los animales DOCA-sal. En principio,

estos resultados parecen indicar que la activación central crónica  $ET_B$  no alteraría el funcionamiento de este mecanismo de regulación a largo plazo de la TH.



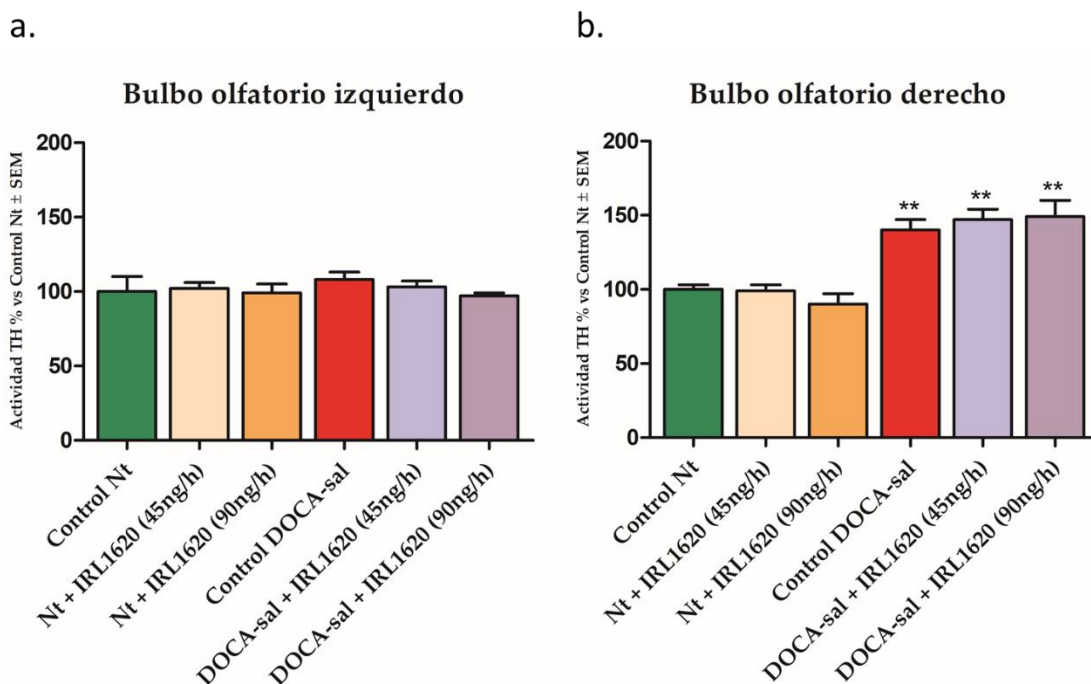
**Figura 35. Efectos de la activación crónica  $ET_B$  sobre la expresión del ARNm de la TH en el hipotálamo anterior y posterior.** **a.** Se grafican los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el hipotálamo anterior de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el hipotálamo posterior. **c y d.** Ejemplos de las rectas de calibración, el perfil del ciclado y la temperatura de melting tanto para  $\beta$ -actina como para la TH. **c.** Parámetros hipotálamo anterior. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -2,94 \cdot \log[conc] + 22,15$ ; eficiencia = 1,19;  $R^2 = 0,987$ . Recta de TH:  $CT = -3,57 \cdot \log[conc] + 25,53$ ; eficiencia = 0,91;  $R^2 = 0,989$ . **d.** Parámetros hipotálamo posterior. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -2,94 \cdot \log[conc] + 22,15$ ; eficiencia = 1,19;  $R^2 = 0,987$ . Recta de TH:  $CT = -3,57 \cdot \log[conc] + 25,53$ ; eficiencia = 0,91;  $R^2 = 0,989$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs Control Nt. Número de animales: 3-4.

### 4.2.3. Bulbos olfatorios.

#### 4.2.3.1. Actividad de la tirosina hidroxilasa.

Al igual que en el hipotálamo, se investigó si la activación a largo plazo del receptor  $ET_B$  es capaz de modificar el funcionamiento del sistema catecolaminérgico en el BO de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal. Se evaluó la actividad de la TH en el BO izquierdo y derecho mediante el ensayo radioenzimático descrito en Materiales y Métodos.

Por un lado, la infusión crónica de IRL1620 no produjo cambios en la actividad de la TH en el BO izquierdo de ninguno de los grupos estudiados (Figura 36.a). De igual manera, tampoco hubo cambios en la actividad de la TH en el BO derecho entre los grupos Nt (control y tratados) (Figura 36.b). Sin embargo, aquí los controles DOCA-sal tuvieron un aumento de la actividad enzimática del 40%. Asimismo, este incremento en los animales hipertensos no se vio modificado debido a la administración del agonista  $ET_B$  bajo ninguna de las dosis (Figura 36.b).



**Figura 36. Efectos de la activación crónica  $ET_B$  sobre la actividad de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo y derecho.** a. Se grafican los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el bulbo olfatorio izquierdo de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. b. Se observan los cambios en la actividad de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el bulbo olfatorio derecho. \*\*  $p < 0,01$  vs Control Nt. Número de animales: 3-5.

Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, en los animales DOCA-sal la actividad de la TH no se ve alterada en el BO izquierdo y se encuentra aumentada en el derecho.

Además, la activación crónica de los receptores ET<sub>B</sub> centrales no modularía la actividad a largo plazo de la TH tanto en las ratas Nt como DOCA-sal.

#### **4.2.3.2. Expresión de la tirosina hidroxilasa total y fosforilada.**

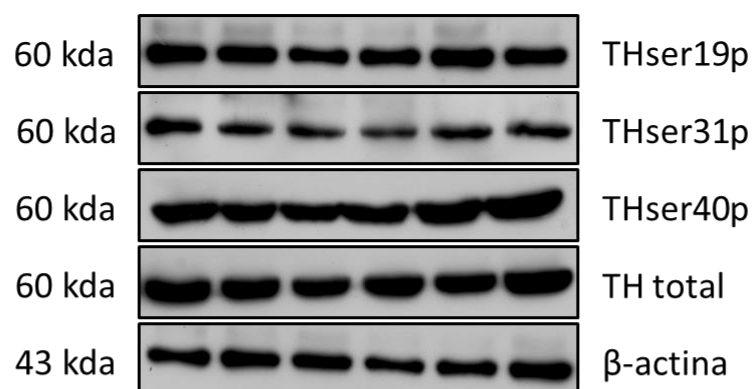
Se evaluaron los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el BO de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal para estudiar si la activación a largo plazo del receptor ET<sub>B</sub> modifica este mecanismo de regulación catecolaminérgica. Estos experimentos se realizaron en el BO izquierdo y derecho por separado según el protocolo de WB descrito en Materiales y Métodos.

La activación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales no modificó los niveles de expresión ni fosforilación de la TH en el BO izquierdo de ninguno de los grupos estudiados (Figura 37).

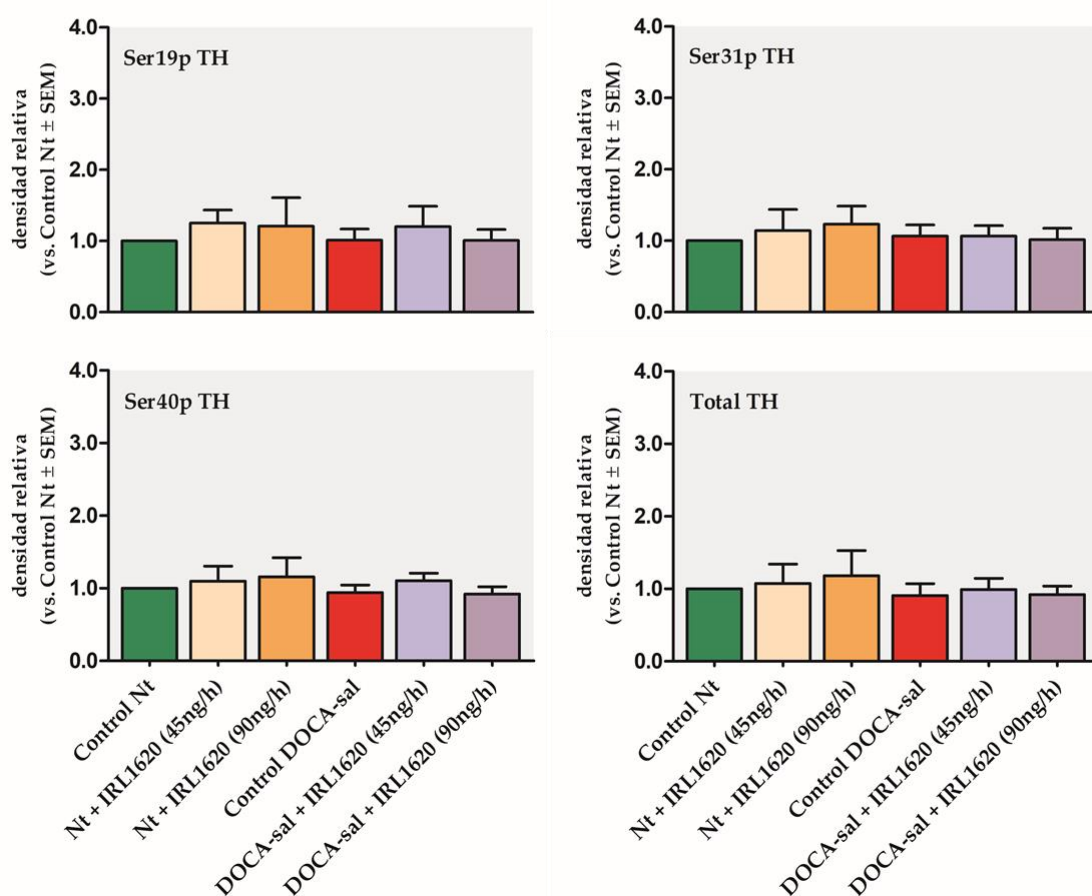
Por el contrario, el BO derecho de los controles DOCA-sal mostró un aumento del 72% en los niveles totales de la TH. Asimismo, este incremento se vio acompañado en igual sentido por todas las fosforilaciones. En estos animales, la activación crónica ET<sub>B</sub> no tuvo efectos sobre los valores totales de la TH ni de sus variantes fosforiladas (Figura 38).

En el BO existe una expresión de la TH aumentada en la hemiporción derecha de los animales DOCA-sal, acompañada por cambios en el estado de fosforilación de la enzima. Por su parte, este mecanismo de regulación de la TH en el BO izquierdo, a diferencia del derecho, parece no responder al tratamiento DOCA-sal. Además, como se vio anteriormente y de manera preliminar, parece que la activación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales no modularía este componente regulatorio en el BO en general.

a.

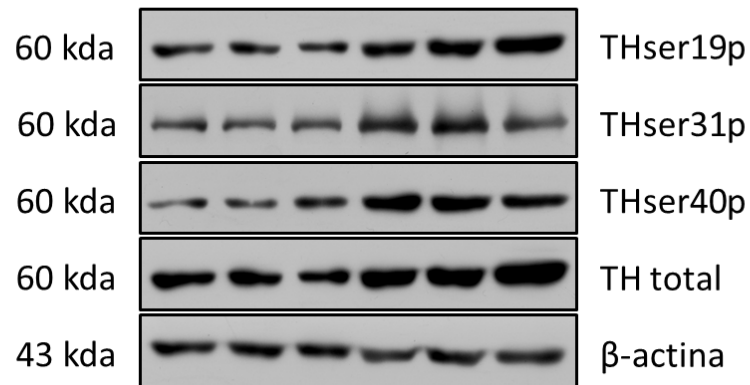


b.

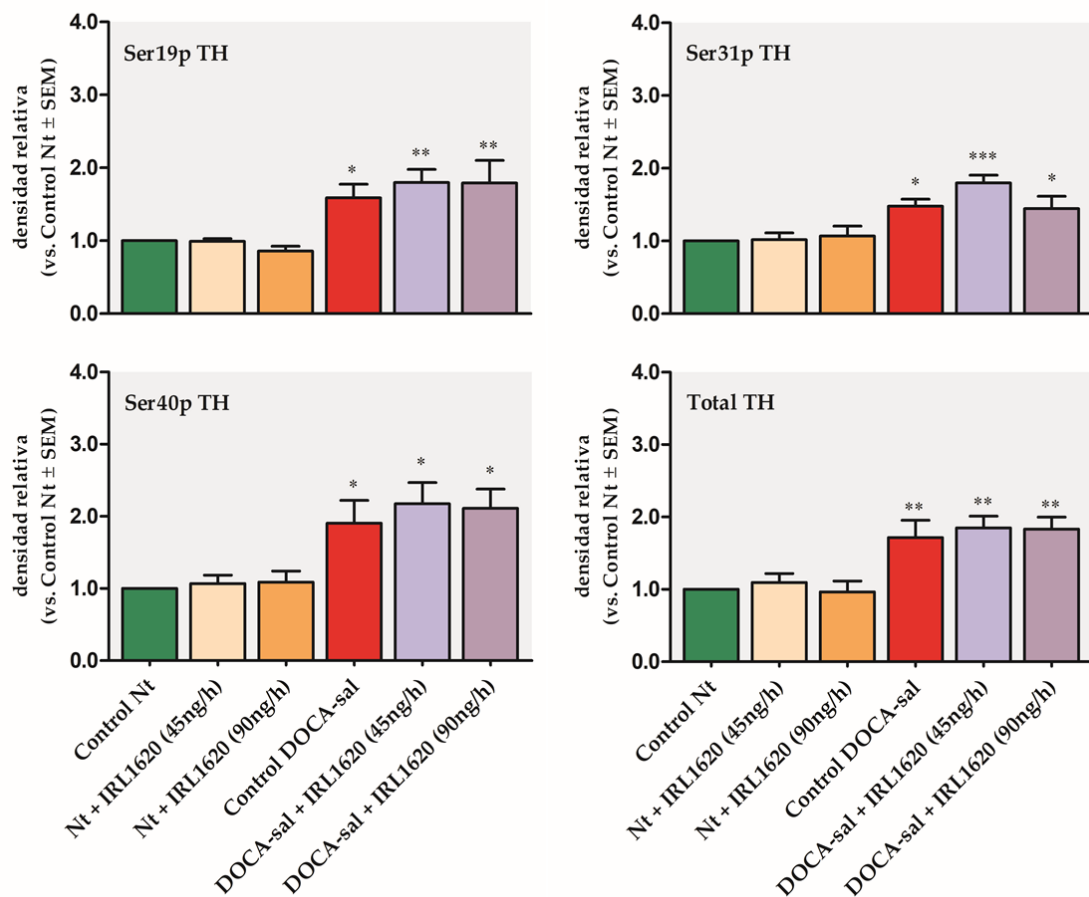


**Figura 37. Efectos de la activación crónica ET<sub>B</sub> sobre la fosforilación y expresión de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo. Se utilizó β-actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). No se observaron diferencias significativas en las distintas fosforilaciones ni en la expresión total de la TH bajo ninguno de los tratamientos. Número de animales: 5.

a.



b.



**Figura 38. Efectos de la activación crónica ET<sub>B</sub> sobre la fosforilación y expresión de la TH en el bulbo olfatorio derecho.** a. Inmunoblots representativos obtenidos mediante western blot de los niveles de expresión y fosforilación de la TH en el bulbo olfatorio derecho. Se utilizó β-actina como control de carga. b. Arriba se grafican los niveles de fosforilación en las serinas 19 (izquierda) y 31 (derecha), mientras que abajo se observa el nivel de fosforilación en la serina 40 (izquierda) y la expresión total de la enzima (derecha). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 vs Control Nt. Número de animales: 5.

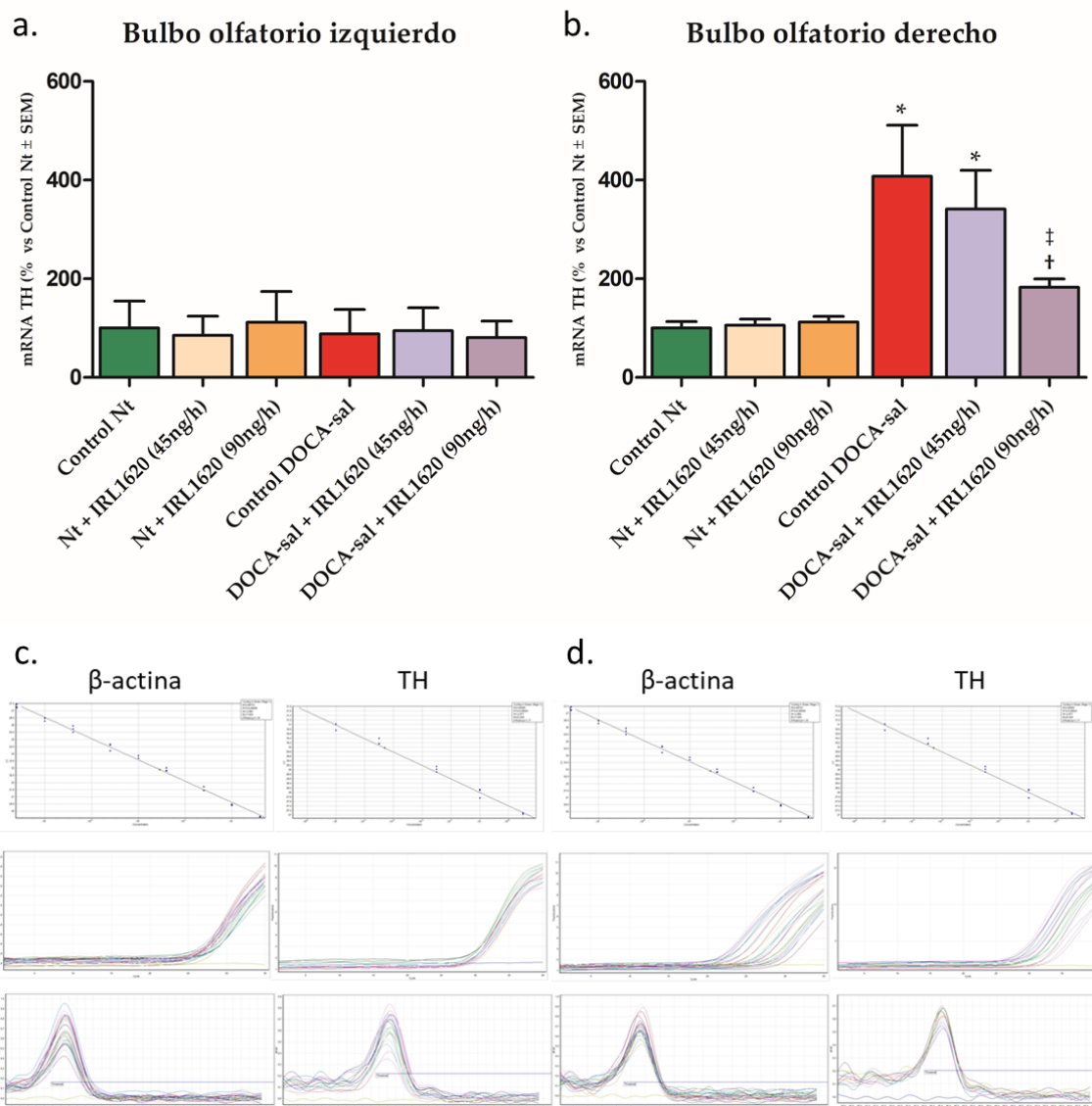
#### **4.2.3.3. Expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa.**

Se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real para establecer si la activación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales modifica los niveles del ARNm de la TH en el BO izquierdo y derecho de ratas Nt e hipertensas DOCA-sal.

De igual manera que en los experimentos de actividad y expresión de la TH, no hubo cambios en la expresión del ARNm de esta enzima en el BO izquierdo de ninguno de los grupos evaluados (Figura 39.a).

Por otro lado, si bien el tratamiento con IRL1620 (45ng/h o 90ng/h) no modificó la expresión del ARNm de la TH en el BO derecho de los animales Nt, sí se produjo un importante aumento del 308% en el Control DOCA-sal. De manera interesante, este incremento se vio revertido solamente por la administración de IRL1620 en la dosis de 90ng/h (Figura 39.b).

Como era de esperar, la expresión del ARNm de la TH en el BO de las ratas DOCA-sal muestra valores aumentados en la hemiporción derecha, al ser comparado con el Control Nt, sin cambios en la región izquierda. El tratamiento con IRL1620 no modificó la expresión del mensajero en el BO izquierdo, pero llamativamente, sí logró revertir los valores encontrados en el BO derecho de estos animales. Esto ocurrió sólo al administrarse una dosis de 90ng/h. Estos resultados muestran que, a nivel transcripcional, el sistema catecolaminérgico del BO derecho se encontraría alterado en los animales DOCA-sal. Asimismo, sugieren que, bajo ciertas condiciones, la modulación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales podría modificar este parámetro.



**Figura 39. Efectos de la activación crónica  $ET_B$  sobre la expresión del ARNm de la TH en el bulbo olfatorio izquierdo y derecho.** **a.** Se grafican los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el bulbo olfatorio izquierdo de animales normotensos e hipertensos DOCA-sal. **b.** Se observan los cambios en la expresión del ARNm de la TH debido al tratamiento con el agonista IRL1620 (dosis crónica: 45ng/h o 90ng/h) en el bulbo olfatorio derecho. **c y d.** Ejemplos de las rectas de calibración, el perfil del ciclado y la temperatura de melting tanto para  $\beta$ -actina como para la TH. **c.** Parámetros bulbo olfatorio izquierdo. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -2,95 \cdot \log[\text{conc}] + 17,69$ ; eficiencia = 1,18;  $R^2 = 0,995$ . Recta de TH:  $CT = -2,98 \cdot \log[\text{conc}] + 25,02$ ; eficiencia = 1,17;  $R^2 = 0,989$ . **d.** Parámetros bulbo olfatorio derecho. Recta de  $\beta$ -actina:  $CT = -2,95 \cdot \log[\text{conc}] + 17,69$ ; eficiencia = 1,18;  $R^2 = 0,995$ . Recta de TH:  $CT = -2,98 \cdot \log[\text{conc}] + 25,02$ ; eficiencia = 1,17;  $R^2 = 0,989$ . \*  $p < 0,05$  vs Control Nt; †  $p < 0,05$  vs Control DOCA-sal; ‡  $p < 0,05$  vs DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h). Número de animales: 3-4.

#### 4.2.4. Resumen: Activación crónica del receptor $ET_B$ .

Los resultados de la activación central crónica de los receptores  $ET_B$  en animales Nt y DOCA-sal conscientes se resumen en la tabla 11. Podemos decir que los animales Nt no muestran cambios en los parámetros hemodinámicos estudiados debido a este tratamiento

(Figuras 28-31). En estos grupos, tampoco se vio alterado el sistema catecolaminérgico en el hipotálamo o el BO debido al tratamiento (Figuras 32-39). Esto indica que la administración a largo plazo de IRL1620 no alteraría el comportamiento de estos mecanismos, sugiriendo que este agonista específico ET<sub>B</sub> (al igual que el bloqueo ET<sub>A</sub>) no tendría un efecto *per sé* sobre animales normotensos.

En los controles DOCA-sal se encontró un aumento de la PAS sin cambios en la FC (Figuras 28-31). El tratamiento crónico con IRL1620 produjo una reducción global de la PAS en los animales DOCA, sin afectar la FC.

El HA y el HP de los animales DOCA-sal respondió de forma similar a lo observado en los experimentos crónicos con el antagonista ET<sub>A</sub>. Sin embargo, la activación crónica de los receptores ET<sub>B</sub> centrales en estos animales hipertensos no modificó los parámetros de la TH estudiados tanto en el HA como en el HP manteniéndose en valores similares a los observados en los controles hipertensos (Figuras 32-35). Es importante destacar que lo observado debido a la activación ET<sub>B</sub> a largo plazo en el HA concuerda con lo demostrado bajo el mismo tratamiento realizado de manera aguda, donde el agonista ET<sub>B</sub> tampoco produjo modificaciones en esta área de los animales DOCA-sal [337]. Hasta el momento, los resultados sugieren que en condiciones patológicas como las del modelo DOCA-sal, el sistema catecolaminérgico hipotalámico estaría influenciado en el largo plazo en mayor medida por el receptor ET<sub>A</sub>. Mientras tanto, los efectos de la activación crónica de los receptores ET<sub>B</sub> centrales no son claros.

Por otro lado, el BO de los animales hipertensos mostró la misma respuesta asimétrica descrita anteriormente. En el BO derecho de las ratas DOCA-sal se observó un aumento de todas las variables estudiadas respecto de la regulación de la TH, pero el tratamiento con el agonista ET<sub>B</sub> no modificó esta situación (Figuras 36-39). La única excepción se presentó en el estudio de los niveles del ARNm de la TH, allí la activación a largo plazo mediante del receptor ET<sub>B</sub> (IRL1620 90ng/h) disminuyó los niveles aumentados en el BO derecho. Sin embargo, al igual que en el hipotálamo, hasta el momento podemos decir que la ausencia de respuesta durante la activación crónica ET<sub>B</sub> parece indicar que sería el receptor ET<sub>A</sub> quien tiene un papel preponderante en la modulación del sistema catecolaminérgico en el BO derecho de las ratas DOCA-sal.

Los animales tratados durante 7 días con cualquiera de las dosis de IRL1620 tuvieron una significativa disminución de la PAS (sin cambios en la FC), pero por algún motivo esta situación no se sostuvo en el tiempo (Figuras 28 y 29). Aun así, esto muestra que la

activación de los receptores ET<sub>B</sub> centrales tiene un efecto en la modulación de la PAS en el modelo DOCA-sal.

| EFECTOS DEL BLOQUEO CRÓNICO DEL RECEPTOR ET <sub>B</sub> |                          |    |                                       |           |               |    |    |                  |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|----|---------------------------------------|-----------|---------------|----|----|------------------|
| Elementos estudiados >                                   | Parámetros Hemodinámicos |    | Regulación de la Tirosina hidroxilasa |           |               |    |    |                  |
| Tratamientos<br>v                                        | PAS                      | FC | Actividad                             | Expresión | Fosforilación |    |    | ARNm             |
|                                                          |                          |    |                                       |           | 19            | 31 | 40 |                  |
| <b>HIPOTÁLAMO ANTERIOR</b>                               |                          |    |                                       |           |               |    |    |                  |
| Control Nt                                               | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (45ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (90ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Control DOCA-sal                                         | ↑↑↑                      | ~  | ↓↓                                    | ↓         | ↓             | ↓  | ↓  | ↓↓↓              |
| DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ↓↓                                    | ↓         | ↓             | ↓  | ↓  | ↓↓↓              |
| DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ↓↓                                    | ↓         | ↓             | ↓  | ↓  | ↓↓↓              |
| <b>HIPOTÁLAMO POSTERIOR</b>                              |                          |    |                                       |           |               |    |    |                  |
| Control Nt                                               | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (45ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (90ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Control DOCA-sal                                         | ↑↑↑                      | ~  | ↑↑                                    | ↑         | ↑             | ~  | ↑  | ↑↑↑              |
| DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ↑↑                                    | ↑         | ↑             | ~  | ↑  | ↑↑↑              |
| DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ↑↑                                    | ↑         | ↑             | ~  | ↑  | ↑↑↑              |
| <b>BULBO OLFATORIO IZQUIERDO</b>                         |                          |    |                                       |           |               |    |    |                  |
| Control Nt                                               | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (45ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (90ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Control DOCA-sal                                         | ↑↑↑                      | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| <b>BULBO OLFATORIO DERECHO</b>                           |                          |    |                                       |           |               |    |    |                  |
| Control Nt                                               | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (45ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Nt + IRL1620 (90ng/h)                                    | ~                        | ~  | ~                                     | ~         | ~             | ~  | ~  | ~                |
| Control DOCA-sal                                         | ↑↑↑                      | ~  | ↑↑                                    | ↑         | ↑             | ↑  | ↑  | ↑↑↑              |
| DOCA-sal + IRL1620 (45ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ↑↑                                    | ↑         | ↑             | ↑  | ↑  | ↑↑↑              |
| DOCA-sal + IRL1620 (90ng/h)                              | ↓/~ <sub>D</sub>         | ~  | ↑↑                                    | ↑         | ↑             | ↑  | ↑  | ↓↓↓ <sub>D</sub> |

**Tabla 11. Resumen de los efectos de la activación crónica del receptor ET<sub>B</sub>.** Se describen los cambios producidos debido al tratamiento a largo plazo con IRL1620 en el HA, HP, BO izquierdo y derecho de los animales Nt y DOCA-sal. Los factores estudiados son representados indicando si no hubo diferencias significativas respecto del Control Nt (~) o bien, si se produjeron aumentos (↑) o disminuciones (↓). La cantidad de flechas dan una idea de la amplitud del cambio observado y el subíndice D indica que la comparación es versus el Control DOCA-sal. En los animales DOCA-sal tratados con IRL1620 se indica que hubo una disminución de la PAS, pero que al final del tratamiento los valores obtenidos fueron similares a los del control DOCA-sal.

---

## 5. Discusión

---

Durante la introducción al presente trabajo de tesis doctoral hemos descripto las características y la importancia de la HTA. Su elevada prevalencia a escala global junto con su avance progresivo y silencioso, que se manifiesta mediante el daño ocasionado a largo plazo en los órganos blanco, son los factores claves que mantienen una alta tasa de mortalidad. Estas muertes ocurren principalmente por accidentes cerebrovasculares, renales o cardiovasculares. Esta enfermedad puede originarse a través de múltiples factores interrelacionados lo cual la convierte en una patología muy compleja para su estudio, prevención y tratamiento. Si bien la HTA es estudiada desde hace muchas décadas por una gran cantidad de grupos de investigación, aún los mecanismos subyacentes a su génesis, desarrollo y mantenimiento siguen siendo poco claros. Desde hace casi 20 años nuestro laboratorio viene investigando el papel del sistema endotelinérgico central en la regulación de la fisiología cardiovascular y en la HTA. Como hemos visto, mediante experimentos *ex vivo* encontramos que este sistema interactúa con el catecolaminérgico en tejidos fuertemente relacionados con la regulación central de la PA como el HA y el HP, así como también en el BO de ratas normotensas [211,212,259–261,266,286,287,308]. Posteriormente, esta interacción fue evaluada en un modelo de HTA sal dependiente como el DOCA-sal [161,162]. En esa oportunidad, nuestro laboratorio encontró diferencias importantes en los distintos pasos de la transmisión noradrenérgica en estas áreas del SNC, al ser comparadas con las de animales normotensos. Durante los últimos años, a través del trabajo de la Dra. Julia Guil [337], se investigó el papel de la interacción entre sistema endotelinérgico endógeno central y el catecolaminérgico en relación con el desarrollo de HTA. De esta forma, mediante la administración aguda ICV del antagonista ET<sub>A</sub> BQ-610 o del agonista ET<sub>B</sub> IRL1620 en ratas anestesiadas se estudió la participación de estos receptores tanto en animales normotensos como DOCA-sal. Por un lado, se evaluó la distribución de ambos receptores y los efectos agudos de los tratamientos sobre el sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO. En paralelo, se indagó sobre las consecuencias de estos manipuleos experimentales sobre la PA y la FC. Los experimentos a corto plazo sentaron las bases para poder realizar los experimentos crónicos, en animales conscientes, presentados en este trabajo de tesis. Los estudios a largo plazo nos permiten investigar las implicancias de los receptores de las ETs sobre la regulación del sistema catecolaminérgico

en estas importantes áreas del SNC. Además, podemos evaluar comparativamente si el bloqueo  $ET_A$  o la activación  $ET_B$  de manera crónica presenta diferencias con lo observado a corto plazo. A su vez, sirven para estudiar las consecuencias de estos tratamientos sobre la regulación central de la PA en la hipertensión DOCA-sal.

A continuación, discutiremos este modelo de HTA sal dependiente en comparación con estados fisiológicos normales en cuanto a sus consecuencias sobre la PA y el estado basal del sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO. Posteriormente, nos adentraremos en las implicancias de los receptores de las ETs y los efectos a largo plazo de los tratamientos.

## **5.1. El modelo DOCA-sal.**

El modelo DOCA-sal fue llevado a cabo mediante la administración subcutánea de DOCA y el agregado de 1 NaCl en el agua de bebida. Como se mencionó en la introducción, el modelo sería dependiente de la sal desde el comienzo del tratamiento y la DOCA actuaría aumentando el apetito del animal por el sodio facilitando el aumento de la PA [149,177–180]. En este modelo, se demostró que los niveles de sodio plasmáticos y en el LCR se encuentran aumentados [157,158]. Además, el bloqueo central de canales de este catión reduce la PA en estos animales hipertensos [181]. Es importante destacar que la  $ET-3$  modula la sensibilidad de estos canales en el órgano circunventricular, una de las regiones del SNC más relacionadas con la detección de sodio, lo cual de alguna manera sugiere la participación del sistema endotelinérgico [182]. Además, se vio que para mantener la sensibilidad a la sal en este modelo de HTA se requiere también de una menor actividad de neuronas catecolaminérgicas en el HA [189].

Relacionándolo con la HTA en humanos, hemos mencionado que el consumo elevado de sodio es uno de los factores importantes para el desarrollo de HTA, destacando que gran parte de la población mundial supera por amplio margen el consumo diario recomendado [1,21–23]. Se estima que el 26% de la población normotensa y el 51% de la población hipertensa es sensible a la sal, lo que indica que este elemento podría ser un indicador clave en las personas que están predispuestas al desarrollo de HTA [149]. Se demostró que dietas reducidas en sodio, acompañadas de un plan alimentación acorde, disminuyen la PA tanto en pacientes normotensos como hipertensos [24–27]. Por el contrario, la ingesta elevada de este ion y el consecuente aumento de la PA irían acompañados de alteraciones a nivel noradrenérgico [30,31]. En el modelo DOCA-sal el incremento de los niveles de sodio conlleva a la retención de agua y esto a un aumento de la volemia con consecuencias sobre

los valores de PA. Cabe mencionar que en estos animales la retención de sodio se ve facilitada por un tono simpático renal exacerbado [184]. Estas son algunas de las razones por lo cual elegimos estudiar los mecanismos implicados en el aumento de la PA en este modelo, ya que es justamente la descarga simpática uno de los factores que podrían tener mayor relevancia en el desarrollo y mantenimiento de la HTA sal dependiente.

En este sentido, hemos visto que la regulación rápida de la PA por parte del sistema nervioso depende de los mecanismos de *feedback* (como por ejemplo el barorreflejo) y anticipación (comandos centrales superiores) teniendo como sistema efector el balance autonómico [36]. La resultante del accionar de estos mecanismos se observa en la modulación de la descarga simpática y/o parasimpática. Se ha reportado una descarga simpática aumentada en el modelo DOCA-sal donde la actividad del sistema catecolaminérgico a nivel periférico también se vio incrementada principalmente debido a un aumento de la ET-1 circulante [75,184,185]. A nivel central, se describió que el área AV3V de Brody es necesaria para el mantenimiento de los valores elevados de PA en este modelo [53,72,186,187] y la activación del LC los incrementa aún más [93]. Asimismo, se reportó que el hipotálamo también aumentaría la descarga simpática y la respuesta vasopresora a nivel periférico lo que sería indispensable para el aumento de la PA [188].

El aumento de la PA en el modelo DOCA-sal ocurre en dos fases. Durante los primeros días ocurre un aumento inicial y luego un segundo incremento que se mantiene durante semanas [149]. Durante la primera parte de la tercera semana de tratamiento los animales presentan una PA significativamente superior pudiendo ser considerados como hipertensos [53,154,157,184,340,367,368]. En nuestro laboratorio el tratamiento durante 5 semanas permitió alcanzar valores de PAS cercanos a los 160mmHg [161,162] y en el presente trabajo los controles DOCA-sal alcanzaron un máximo de 173 mmHg al final del tratamiento.

En cuanto a la FC, los trabajos publicados son contradictorios. Por un lado algunos autores indican que no hay diferencias en la FC de las ratas DOCA-sal al ser comparadas con las normotensas [157,340,368], mientras que otros aseguran que existe un aumento leve, pero significativo en favor de los hipertensos [369]. En este aspecto, nosotros no encontramos diferencias sustanciales entre los controles Nt y DOCA-sal a lo largo de todo el tratamiento. Es importante destacar que en el modelo DOCA-sal el barorreflejo se encuentra alterado, inclusive antes del aumento de la PAS pudiendo ser esto una de las razones de la falta de respuestas significativas en la FC [149,370–373].

El modelo también se caracteriza por el desarrollo de hipertrofia del VI. El IHVI en trabajos publicados anteriormente marca un incremento del 25-36% en los animales DOCA-sal comparados con los normotensos [161,162,340,368]. Nuestros resultados están de acuerdo con esto, dado que obtuvimos un 42% de aumento en las ratas hipertensas.

Como hemos mencionado anteriormente, otro factor importante en este modelo de hipertensión sal dependiente son las ETs y sus receptores. La distribución del sistema endotelinérgico a lo largo de todo el cuerpo, incluido el SNC le confiere la capacidad participar en la regulación muchas funciones fisiológicas [113,244–246,304–306]. A nivel periférico, una de las principales es la de la regulación del tono vascular. Allí pueden provocar vasoconstricción mediante la activación de  $ET_A/ET_B$  en las células de la musculatura vascular o vasodilatación mediante  $ET_B$  en las células endoteliales [154,168,244,247,321]. En el modelo DOCA-sal se observó que la ET-1 circulante está aumentada, así como también la actividad de ambos receptores demostrando que juegan un papel relevante en el tono vascular y el aumento de la PA de manera crónica en este modelo [33,150,152,167–169]. En virtud de ello se ha reportado que la inhibición periférica de los receptores de las ETs disminuye la PA [53,149,150,152,169,170,281,294,320].

Por su parte, a nivel del SNC el sistema endotelinérgico se encuentra presente en diversas áreas, entre ellas las estudiadas en el presente trabajo de tesis [113,128,129,131,265,305,307]. Muchos trabajos avalan el papel de las ETs como moléculas neuromoduladoras, poniendo especial énfasis en su interacción con la transmisión catecolaminérgica a través del accionar tanto de  $ET_A$  como de  $ET_B$  [33,68,113,123,161,162,211,212,259–261,266,286,287,308]. Por lo tanto, no sería ilógico pensar que los cambios a nivel cardiovascular tal vez ocurran a través de este mecanismo. En este sentido, se reportó que la administración central de ETs produce un aumento de la descarga simpática, de los niveles plasmáticos de las catecolaminas, de la respuesta vasopresora y de la de PA [113,281,304,309–318]. Además, estos efectos pudieron ser revertidos mediante la inhibición ganglionar [113] o de los receptores  $ET_A$  en el área periacueductal [171]. Como hemos anticipado anteriormente, nuestro grupo ha demostrado que las ETs centrales modulan los distintos pasos de la transmisión noradrenérgica en el HA, HP y el BO de ratas normotensas e hipertensas DOCA-sal, principalmente a través de los receptores  $ET_A$  y  $ET_B$  [161,162,211,212,259–261,266,282,286,287,308]. No obstante, antes de adentrarnos en el rol del sistema

endotelinérgico endógeno central, es importante entender el estado basal de la actividad catecolaminérgica del hipotálamo y el BO en los animales DOCA-sal.

### **5.1.1. El sistema catecolaminérgico hipotalámico.**

Previamente describimos al hipotálamo como una de las regiones del SNC fundamentales para la regulación de la función cardiovascular y que además presenta grandes cambios funcionales y neuroquímicos en animales hipertensos [14,33,34,47,53,67,86,94–96]. También se ha demostrado que el hipotálamo es crucial en la modulación central de la descarga simpática ante la ingesta crónica de cantidades elevadas de sal [98]. Por estas razones fue elegido como una de las áreas de estudio en nuestro laboratorio.

Hace algunos años encontramos que el HA de las ratas DOCA-sal presenta una actividad catecolaminérgica disminuida en comparación con la misma área en animales normotensos (Abramoff, resultados no publicados). Los resultados hallados en el presente trabajo de tesis pudieron corroborar esta situación mostrando una disminución de la actividad enzimática de la TH, respaldada por una menor expresión y fosforilación. A esto podemos sumarle que los niveles del ARNm de la TH también son menores en los animales DOCA-sal en comparación con los controles Nt. Estas evidencias indican claramente una alteración del sistema catecolaminérgico en el HA, sugiriendo una menor actividad simpatoinhibitoria de esta área, lo cual podría contribuir a una descarga simpática aumentada en este modelo de hipertensión sal dependiente.

Por otro lado, nuestro laboratorio también demostró una mayor actividad catecolaminérgica en el HP de las ratas DOCA-sal comparadas con las normotensas [162]. Además, esto tuvo consecuencias sobre la transmisión noradrenérgica dado que se halló una mayor liberación y captación de NA acompañada por un aumento en la expresión y actividad del NET [162]. Es así como los resultados en el presente trabajo también concuerdan con este escenario en el HP de los controles hipertensos. De modo que, hallamos un aumento en la expresión y los niveles de fosforilación de la TH en esta área, acompañadas por una mayor actividad enzimática. Al mismo tiempo, y en concordancia con lo encontrado anteriormente [337], también observamos que allí los niveles de expresión del ARNm de la TH estaban incrementados. Esto pone en evidencia una alteración del sistema catecolaminérgico,

ahora en el HP, sugiriendo que habría una mayor actividad simpatoexcitatoria de esta área lo cual, junto con lo observado en el HA, podría contribuir a una descarga simpática aumentada en la hipertensión DOCA-sal.

### **5.1.2. El sistema catecolaminérgico en el bulbo olfatorio.**

A pesar de presentar numerosas conexiones con áreas del SNC implicadas en la regulación de la función cardiovascular el BO ha sido una región poco estudiada en este aspecto [105,110,112–115]. Trabajos previos nos llevan a plantear que el BO podría tener un papel relevante en situaciones donde la función cardiovascular está alterada, como es el caso de la HTA. Por estas razones en nuestro laboratorio decidimos estudiar el BO como una probable área relacionada con el desarrollo y mantenimiento de la HTA en el modelo DOCA-sal.

Hemos mencionado que una publicación de nuestro grupo de investigación demostró que en el BO de los animales DOCA-sal existe un comportamiento asimétrico entre la hemiporción izquierda y derecha, siendo esta la razón principal por la cual en este trabajo de Tesis Doctoral se los estudió por separado. De modo que, en los animales normotensos se observó que el BO izquierdo y derecho no presentan diferencias en cuanto a la expresión, fosforilación y actividad de la TH, así como tampoco en la liberación de NA [161]. En contraste, la hipertensión DOCA-sal provocó un aumento de la actividad catecolaminérgica en el BO derecho [161]. Estos resultados fueron reconfirmados posteriormente en nuestro laboratorio a través de los trabajos de la Dra. Guil [337], a los cuales se le sumó un dato adicional que fue un aumento en los niveles de expresión del ARNm de la TH en las ratas hipertensas. No obstante, es importante remarcar que en estos últimos experimentos el BO fue estudiado entero, como un tejido único, por lo tanto no podemos saber si los resultados obtenidos presentaron diferencias entre ambas hemiporciones [337]. Todos estos hallazgos coinciden con lo mostrado en el presente trabajo de tesis, donde encontramos que en el BO derecho de los animales DOCA-sal se produjo un aumento de la expresión de la TH, su fosforilación en todas las serinas estudiadas y consecuentemente en su actividad enzimática. Asimismo, también obtuvimos un aumento de los niveles transcripcionales de ARNm de la TH. Por el contrario, todas estas variables no se vieron modificadas debido al tratamiento DOCA-sal en el BO

izquierdo, volviendo a poner en evidencia la asimetría funcional observada en trabajos anteriores.

Por lo tanto, estas evidencias exponen una alteración del sistema catecolaminérgico en el BO de los animales hipertensos, principalmente en la región derecha. Teniendo en cuenta las relaciones que esta área tiene con los distintos núcleos del SNC antes nombrados, podemos pensar que el BO también podría contribuir al desbalance autonómico a favor de una descarga simpática incrementada en la hipertensión DOCA-sal.

Hasta aquí, hemos delimitado las diferencias entre las ratas en condiciones fisiológicas normales y las alteraciones producidas por la hipertensión DOCA-sal, tanto a nivel hemodinámico como en las regiones estudiadas del SNC. En conjunto y de manera resumida, dijimos que este modelo de HTA sal dependiente provoca un aumento sostenido de la PAS, sin cambios en la FC, junto con el desarrollo de hipertrofia del VI. Además, modifica el estado del sistema catecolaminérgico central, al menos en el HA, HP y el BO derecho de estos animales. En principio, podríamos decir que existe un aumento de la actividad noradrenérgica en el HP y el BO derecho, acompañado de una disminución en el HA. Esta situación llevaría a una descarga simpática aumentada lo cual sería un factor crucial en el mantenimiento de la PAS en las ratas DOCA-sal.

Es pertinente decir que estos resultados no son novedosos, dado que como se describió a lo largo del texto fueron estudiados con anterioridad, principalmente en nuestro laboratorio. Sin embargo, la confirmación de estos nos sirve como bases sólidas para analizar las consecuencias derivadas del bloqueo central de los receptores ET<sub>A</sub> o la activación ET<sub>B</sub> a largo plazo. De esta manera, podremos obtener conclusiones interesantes respecto de la implicancia del sistema endotelinérgico central en el desarrollo y mantenimiento de la HTA DOCA-sal.

## **5.2. Implicancias de los receptores de las endotelinas.**

Hemos repasado diversos trabajos avalando la hipótesis de que en patologías como la HTA el sistema endotelinérgico podría estar alterado [33,244,245,257]. Es interesante remarcar que se observó que en diferentes modelos animales de hipertensión (DOCA-sal, SHR-SP, Dahl sensibles, Goldblatt 1, inducido por angiotensina) este sistema está *up-regulado*, mientras que en otros no (SHR, Goldblatt II o inducida por L-NAME) [374–380].

Además, como mencionamos anteriormente, la administración central de ETs produce cambios en la descarga simpática, incrementan los niveles plasmáticos de catecolaminas, inducen vasoconstricción y aumentan la PA [113,281,304,309–318]. Asimismo, algunos autores sugieren que las ETs modulan el tono vascular tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas también a largo plazo [169,281,294,320]. En este sentido, el papel neuromodulador de las ETs centrales parece ser ejercido, al menos en parte, mediante la interacción con el sistema catecolaminérgico en áreas como el HA, HP y el BO. Por eso resulta interesante pensar que los cambios a nivel cardiovascular observados en la hipertensión DOCA-sal probablemente podrían ser desarrollados y mantenidos a lo largo del tiempo a través de la interacción entre estos sistemas a nivel central.

Durante los últimos años nos abocamos a investigar el papel de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en este modelo de HTA sal dependiente. Como explicamos en la introducción estos receptores desencadenan múltiples cascadas de señalización con efectos principalmente en la fisiología endocrina, neuroendocrina, el balance hidrosalino y la fisiología cardiovascular y renal [113,244,245,247,252,256,281,282]. Sin embargo, aún no se conocen las implicancias a largo plazo de la modulación central de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en la regulación de la función cardiovascular, tanto en estados normales como patológicos. Por estas razones, y además teniendo en cuenta que la mayoría de nuestros trabajos fueron realizados *ex-vivo*, decidimos investigar los efectos de la inhibición de los receptores ET<sub>A</sub> centrales de manera crónica en ratas normotensas e hipertensas DOCA-sal conscientes. Asimismo, evaluamos si la activación de los receptores ET<sub>B</sub> centrales presentan un comportamiento similar a la de los receptores ET<sub>A</sub>. A continuación, se describen las consecuencias de estos tratamientos sobre el sistema catecolaminérgico en el hipotálamo y el BO, así como también sus efectos sobre la PAS y la FC.

### **5.2.1. Hipotálamo anterior y posterior.**

Inicialmente decidimos administrar de manera crónica un antagonista del receptor ET<sub>A</sub> (BQ-610) dado que, de acuerdo a la bibliografía, sería el que presenta mayor relevancia en la respuesta presora producida por las ETs centrales [171,381–384]. Esto surge de diferentes publicaciones donde se investigaron los efectos de administrar, tanto central como periféricamente, antagonistas específicos ET<sub>A</sub> [171,349,385–387]. Así, se demostró que un bloqueante ET<sub>A</sub>, el FR139317, infundido en el área gris periacueductal de ratas hipertensas DOCA-sal disminuye la PA [171]. Lo mismo se logró con un antagonista mixto

(ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>) pero no por uno específico ET<sub>B</sub> (BQ-788), lo cual llevó a pensar que los receptores ET<sub>A</sub> resultaban esenciales en este modelo de HTA [171]. También se comprobó que la administración de ET-1 en esta área elevaba la PA a través de un mecanismo dependiente del sistema catecolaminérgico [388]. En otros estudios se vio que la administración de un antagonista ET<sub>A</sub> junto con ET-1 en la misma región no ejercía respuesta presora, lo que demostraba que este efecto dependía de la estimulación del receptor ET<sub>A</sub> [349,389]. Asimismo, se observó que la infusión de ET-1 en el NPV estimulaba el receptor ET<sub>A</sub> y llevaba a un aumento de la PA junto con una mayor actividad de la descarga simpática renal [390]. Además, se demostró que la administración ICV de Sarafotoxina 6b (potente agonista mixto), produce un aumento transitorio de la PA a través de la activación del sistema nervioso simpático [391,392]. Estos estudios demuestran que la activación central del receptor ET<sub>A</sub> es esencial en modelos de HTA que dependen de la elevación de ET-1 o cuando se aumenta la PA por la administración de ETs [393].

En el presente trabajo encontramos una importante respuesta al bloqueante BQ-610 en el largo plazo, principalmente en los animales DOCA-sal. Recordemos que los primeros indicios de una participación del sistema endotelinérgico central en la modulación catecolaminérgica y en la hipertensión DOCA-sal fueron reportados por nuestro laboratorio. Allí observamos que la incubación del HA de animales normotensos con ETs (ET-1 y ET-3) a corto y mediano/largo plazo (30 minutos y 360 minutos respectivamente) disminuye la actividad, expresión y fosforilación en las serinas 19 y 40 (sin cambios en la serina 31) de la TH [259,287]. Estos efectos fueron acompañados por una menor liberación y mayor recaptación de NA [286,287,308]. De manera interesante, esos resultados en el HA de animales normotensos fueron similares a los observados en los animales DOCA-sal sin la aplicación exógena de ETs (Abramoff y col, resultados no publicados), sugiriendo que este mecanismo podría participar en el origen de la HTA en este modelo. Así, la inhibición crónica de los receptores ET<sub>A</sub> centrales de alguna manera concuerda con este comportamiento, ya que en el HA de los animales hipertensos tratados con BQ-610 (12ng/h o 24ng/h) hay una reversión en la expresión total de la TH y la fosforilación en las serinas 19 y 40 respecto de la disminución encontrada en los controles DOCA-sal. Esta reversión permitió alcanzar valores similares a los hallados en los controles Nt. Como se mencionó anteriormente, un aumento de estas modificaciones postraduccionales son indicadores de una mayor actividad enzimática. De hecho, también se encontró una reversión en la actividad de la TH en estos experimentos. Estos resultados coinciden con los observados previamente

mediante el bloqueo agudo del receptor ET<sub>A</sub> (1 hora), donde se vio que los valores de estos parámetros en los animales tratados tuvieron niveles comparables con los controles Nt [337]. No obstante, diferente es lo que sucede con los niveles del ARNm de TH, dado que ninguno de los tratamientos crónicos modificó la baja expresión encontrada en los animales DOCA-sal. De acuerdo con esto, en el corto plazo tampoco hubo efectos del tratamiento con BQ-610 sobre el estado del mensajero de TH en estos animales [337], sugiriendo que los receptores ET<sub>A</sub> centrales no alterarían el sistema catecolaminérgico en el HA a nivel transcripcional.

De manera complementaria y dado que se ha descrito que los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> suelen presentar efectos antagónicos [244], decidimos estudiar los efectos de la activación de los receptores ET<sub>B</sub> centrales mediante la infusión crónica de IRL1620. En virtud de ello, nos propusimos determinar si este agonista puede ejercer una respuesta similar al bloqueo ET<sub>A</sub>. Además, es pertinente remarcar que no utilizamos un agonista específico ET<sub>A</sub> porque hasta el momento no existe. Tampoco usamos un antagonista ET<sub>B</sub> dado que, si el objetivo último sería buscar alguna utilidad terapéutica para el uso de estas drogas en una patología como la HTA, en principio no tendría sentido utilizar un agente que puede resultar en un aumento de la PA adicional en los animales hipertensos.

En 1995 Rebello y col. demostraron que la administración ICV de IRL1620 durante 30 minutos en animales normotensos no generaba cambios en la PA o la FC sugiriendo que no habría un efecto propio de la droga cuando es aplicada en condiciones fisiológicas normales [391]. Además, se describió que el uso de agonistas específicos ET<sub>B</sub> podrían presentar efectos beneficiosos en el tratamiento de algunas patologías [245,254,394]. En este sentido, algunos trabajos han demostrado que son útiles en la regeneración neuronal y vascular en casos como el infarto isquémico cerebral [348,395,396]. Asimismo, se encontró que el IRL1620 mejoraría las habilidades cognitivas en algunos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo el Alzheimer [348,396]. También se vio que la estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> periféricos en animales hipertensos producen una respuesta vasodilatadora mediada por el ON facilitando la eliminación renal de sodio.

Contábamos con que nuestro laboratorio había demostrado que la aplicación *ex-vivo* y a corto plazo de ETs en el HA de ratas normotensas disminuye la liberación de NA, así como también la expresión, fosforilación y actividad de la TH a través del receptor ET<sub>B</sub> y activando las vías del ON, la PKG y al receptor GABA-A [211,259,282,286,287]. De manera similar, vimos que el HA de las ratas DOCA-sal también presentaba una leve disminución de estos

componentes en comparación con los animales normotensos (Abramoff, resultados no publicados). Por su parte, el tratamiento agudo con IRL1620 en los animales hipertensos solamente había mostrado un incremento en la fosforilación de la serina 40 de la TH, pero esto no afectó su actividad enzimática [337]. Sin embargo, la activación crónica ET<sub>B</sub> (45ng/h o 90ng/h) parece no provocar cambios en ninguno de los parámetros estudiados de la TH, dado que el tratamiento a largo plazo no alteró las disminuciones observadas en el HA de los animales hipertensos.

En conjunto, todos estos resultados podrían indicar que a través de los receptores ET<sub>A</sub> centrales se modularía el sistema catecolaminérgico en el HA de los animales hipertensos en el largo plazo, alterando la expresión y fosforilación de la TH lo que induciría cambios en su actividad enzimática. Sin embargo, ninguno de los receptores parece tener influencia a nivel transcripcional en esta área. De esta forma el mantenimiento a largo plazo de una menor actividad simpatoinhibitoria del HA en la HTA DOCA-sal se debería principalmente a la activación central del receptor ET<sub>A</sub>. Por su parte, el estímulo ET<sub>B</sub> reactivaría levemente esta área simpatoinhibitoria de manera aguda, mientras que no así a largo plazo.

Por otro lado, en el HP las evidencias marcan un comportamiento completamente diferente. Previamente reportamos que la incubación *ex-vivo* del HP de animales normotensos con ETs a corto plazo (30 minutos) provoca una disminución temporal en la fosforilación y actividad de la TH, sin cambios en la expresión de esta. Sin embargo, a los 360 minutos este fenómeno se revertía culminando en un aumento de la expresión y fosforilación de la enzima a través de mecanismos que involucraban a los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> [211,259]. Esto también producía una mayor liberación y menor recaptación de NA debido a la incubación con ETs mediante la participación del receptor ET<sub>B</sub>, lo cual indicaba por un lado una mayor descarga noradrenérgica en esta área y por el otro una menor inhibición por *feedback* negativo de la TH [266,308]. Estos resultados en el HP de animales normotensos también fueron similares a los observados endógenamente en los animales DOCA-sal sin la aplicación exógena de ETs [162]. Es más, cuando se incubó el HP de los animales hipertensos con estos neuropéptidos se logró un incremento aún mayor de la actividad catecolaminérgica en general y un aumento de la descarga noradrenérgica [162].

En el presente trabajo, los resultados obtenidos mediante la inhibición a largo plazo del receptor ET<sub>A</sub> de alguna manera también concuerdan con este comportamiento, ya que en el HP de los animales hipertensos tratados con BQ-610 (12ng/h o 24ng/h) hay una reversión en la expresión total de la TH y la fosforilación en las serinas 19, 31 y 40 respecto

del aumento observado en los controles DOCA-sal llegando a valores comparables con los controles Nt. También esto se vio reflejado como una reversión en la actividad de la TH, coincidiendo parcialmente con lo observado mediante el bloqueo ET<sub>A</sub> de manera aguda (1 hora), donde se observó que estos parámetros también disminuyeron respecto del control DOCA-sal. Además, en ese caso esto correlacionaba con un incremento en la expresión del receptor ET<sub>A</sub> y con una mayor colocalización ET<sub>A</sub>/TH [337]. Sin embargo, los niveles de expresión de la TH en el HP de los animales hipertensos solamente pudieron ser revertidos mediante el bloqueo del receptor ET<sub>A</sub> a largo plazo, ya que a corto plazo se mantuvieron aumentados [337]. Además, debido al tratamiento crónico con el antagonista ET<sub>A</sub> (12ng/h o 24ng/h) se observó una disminución significativa de la expresión del ARNm de la TH que sin embargo no alcanzó para ser equiparada con la encontrada en los controles Nt. Este resultado también fue similar a lo observado a corto plazo donde los niveles del mensajero estuvieron en un valor intermedio entre los hallados en animales normotensos y DOCA-sal sin tratar [337].

En cuanto a la activación crónica ET<sub>B</sub> en el HP, al igual que en el HA, no produjo cambios en ninguno los parámetros estudiados de la TH, dado que el tratamiento a largo plazo no alteró los incrementos observados en el HP de los animales hipertensos. Esto resulta de alguna manera interesante ya que, bajo el tratamiento agudo con IRL1620, las ratas DOCA-sal habían mostrado por un lado una disminución del ARNm de la TH y por el otro un incremento en la fosforilación de las serinas 19 y 31 sin cambios en la 40 o la expresión total de la enzima [337]. Si bien en ese caso no hubo consecuencias sobre su actividad enzimática, de alguna manera se pone en evidencia que a corto plazo existiría una reacción del sistema catecolaminérgico en el HP dependiente del receptor ET<sub>B</sub> que pareciera perderse a largo plazo.

Estos resultados sugieren que a través de los receptores ET<sub>A</sub> centrales se modularía el sistema catecolaminérgico en el largo plazo también en el HP de los animales hipertensos, alterando la expresión y fosforilación de la TH lo que induciría cambios en su actividad. Los tratamientos crónicos también muestran efectos sobre los niveles del ARNm de la TH, cosa que no sucedió en el HA. Además, es importante destacar que si bien hay una mayor expresión de receptores ET<sub>A</sub> en el HP de los animales DOCA-sal comparados con los normotensos [162,337], como veremos más adelante, esto no implica necesariamente que la respuesta observada mediante el bloqueo crónico sea por un efecto directo en este núcleo. Adicionalmente, pudimos observar un posible papel del receptor ET<sub>B</sub> en la

modulación del sistema catecolaminérgico en los animales hipertensos en tiempos cortos, pero esto no se vio reflejado a largo plazo. De esta forma el mantenimiento de una mayor actividad simpatoexcitatoria del HP en la HTA DOCA-sal pareciera depender mayormente de la activación central del receptor ET<sub>A</sub>. En este sentido, el receptor ET<sub>B</sub> parece responder de manera aguda, pero su activación aquí tampoco logra sostener un efecto a largo plazo.

En cuanto a los animales Nt, la administración crónica de BQ-610 tanto como la de IRL1620 no produjo alteraciones sobre los distintos factores estudiados de la TH en el HA de estas ratas al ser comparadas con sus respectivos controles. Lo mismo se observó en el HP de los animales Nt tratados. De acuerdo con esto, contábamos con trabajos anteriores donde se demostró que la incubación a corto y mediano plazo tanto del HA como del HP con BQ-610 en ratas normotensas no produjo ningún efecto sobre la liberación y recaptación de NA así como tampoco en actividad de la TH [211,259,261,266,286]. Esto también fue validado *in-vivo* mediante la administración ICV de BQ-610 de manera aguda en ratas normotensas, donde no hubo modificaciones en las fosforilaciones de la TH así como tampoco en la expresión de su ARNm [337]. Sin embargo, la incubación *ex-vivo* del HA a corto plazo con IRL1620 llevó a una disminución de la actividad de la TH, sin mostrar cambios en el HP [211,287]. A esto podemos sumarle que la infusión ICV a corto plazo de este agonista ET<sub>B</sub> aumentó la expresión de la TH y su fosforilación en la serina 31 pero disminuyó los niveles del ARNm en el HA de las ratas normotensas. Además, en el HP de estos animales el tratamiento agudo produjo una disminución en la fosforilación de la serina 31 de la TH y un aumento significativo de los niveles de su ARNm [337].

Las diferencias observadas en el hipotálamo debido a la incubación *ex-vivo* o bajo la administración ICV de forma aguda de BQ-610 o IRL1620, en comparación con la infusión crónica en animales conscientes, muestran algunas conclusiones interesantes. Por un lado, que el antagonista BQ-610 no tendría un efecto *per se* en la modulación a largo plazo del sistema catecolaminérgico hipotalámico de los animales en condiciones fisiológicas normales. Por otro lado, que el agonista IRL1620 provocaría una respuesta dual sobre el hipotálamo de las ratas normotensas, dado que en tiempos cortos se observan algunas alteraciones de los distintos parámetros estudiados de la TH y en el largo plazo esta respuesta parece perderse. Esto resulta similar a lo observado en las ratas DOCA-sal, sugiriendo que independientemente que sea un animal Nt o hipertenso el efecto del IRL1620 se manifiesta de manera aguda pero no se sostendría en periodos de tiempo prolongados.

En resumen, en los animales normotensos el antagonista BQ-610 no tendría un efecto sobre la modulación del sistema catecolaminérgico en el hipotálamo, mientras que el agonista IRL1620 solamente muestra un efecto en el corto plazo. Por otro lado, en el modelo DOCA-sal se observa un aumento de la actividad catecolaminérgica en el HP y una disminución en el HA que se correspondería con una mayor descarga simpática. Esta respuesta parece ser mediada en el corto plazo por los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> centrales. Sin embargo, para mantener este estado a lo largo tiempo, sería fundamental la activación ET<sub>A</sub>. Además, la activación central ET<sub>B</sub> no parece emular los efectos observados mediante el bloqueo ET<sub>A</sub>, al menos en el largo plazo.

### **5.2.2. El bulbo olfatorio.**

En el BO también encontramos una importante respuesta al bloqueante ET<sub>A</sub> en el largo plazo, principalmente en los animales DOCA-sal, mientras que la activación crónica ET<sub>B</sub> parece no tener un efecto prolongado.

Las primeras evidencias de una participación del sistema endotelinérgico en la modulación catecolaminérgica del BO y en la hipertensión DOCA-sal fueron reportadas por nuestro laboratorio. Como bien mencionamos anteriormente, la incubación del BO de animales normotensos con ETs a corto y mediano plazo (30 minutos y 240 minutos respectivamente) provocó un aumento de la actividad de la TH. Esto está respaldado por un incremento en los niveles de expresión y fosforilación de la enzima, con la participación de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, involucrando las vías CAMK-II, PKC y PKA [212,260]. Estos tratamientos también indujeron una mayor liberación de NA y a nivel transcripcional provocaron un aumento de la expresión del ARNm de la TH [212,260]. Estos resultados coincidieron con lo encontrado en los animales DOCA-sal, demostrando que en este modelo de HTA el sistema catecolaminérgico del BO estaría modulado por el sistema endotelinérgico central. Además habíamos destacado que los animales hipertensos presentan un comportamiento asimétrico entre las hemiporciones derecha e izquierda [161]. Esta respuesta fue confirmada a través de los distintos tratamientos realizados en el presente trabajo, mostrando que sería la hemiporción derecha la que participa en la modulación del sistema catecolaminérgico del BO. Mediante los hallazgos anteriores y a través de esta tesis remarcamos que existe un aumento de la actividad catecolaminérgica en el BO derecho de las ratas DOCA-sal [161,337]. Además, esto es acompañado por un

incremento en los niveles de mensajero de la TH [161,337]. Asimismo, se destaca que el BO izquierdo no presentó modificaciones en ninguno de estos casos.

En este contexto, la inhibición crónica ET<sub>A</sub> (12ng/h o 24ng/h) mostró una reversión significativa de la expresión y la fosforilación en las serinas 19, 31 y 40 de la TH en el BO derecho de los animales DOCA-sal. Como consecuencia, también disminuyó la actividad enzimática a valores comparables con los animales Nt. Además, los niveles de expresión del ARNm de la TH también fueron revertidos en esta hemiporción del BO de las ratas hipertensas. Estos datos a largo plazo coinciden con los observados mediante el bloqueo agudo del receptor ET<sub>A</sub>, donde las reversiones en estos parámetros también alcanzaron valores similares a los del control Nt. Esos tratamientos también habían mostrado un incremento en la expresión del receptor ET<sub>A</sub> y una mayor colocación ET<sub>A</sub>/TH a nivel de los glomérulos olfatorios. Como mencionamos anteriormente, siempre hay que tener en cuenta que los ensayos de carácter agudo fueron realizados sin diferenciar las hemiporciones, por lo tanto no podemos saber si este efecto observado a corto plazo es proporcionado exclusivamente por una de ellas o por ambas a la vez [337].

Por otro lado, la activación crónica ET<sub>B</sub> no provocó alteraciones en el sistema catecolaminérgico del BO derecho de los animales DOCA-sal, dado que el tratamiento a largo plazo con IRL1620 (45ng/h o 90ng/h) no alteró los incrementos observados en los distintos parámetros estudiados de la TH. Por el contrario, el tratamiento agudo con el agonista había provocado una menor expresión de la TH, acompañada en el mismo sentido por las fosforilaciones de las serinas 19 y 40 en el BO de los animales DOCA-sal. Como consecuencia también había disminuido su actividad enzimática [337]. En cuanto a los niveles de expresión del ARNm de la TH, el tratamiento a corto plazo había provocado una disminución significativa de este parámetro en el BO debido a la activación ET<sub>B</sub> [337]. Este fue el único punto de coincidencia entre el tratamiento agudo y el crónico, ya que en el presente trabajo de tesis también encontramos que el IRL1620 provocó un decrecimiento de este parámetro en el BO derecho. Es más, también observamos que la dosis de 90ng/h tuvo un efecto mayor que la de 45ng/h. Si bien nos sirve como referencia, debemos tener en cuenta dos consideraciones, por un lado, que los efectos agudos son una combinación de ambas hemiporciones, dado que el tejido no fue discriminado en izquierdo y derecho [337]. Por otro lado, estos tratamientos a corto plazo son los únicos antecedentes en este sentido, por lo tanto, y con las precauciones del caso, también serán utilizados para la comparación temporal en el BO izquierdo. A este respecto, el BO izquierdo de los animales

DOCA-sal no mostró ningún cambio en el sistema catecolaminérgico debido al bloqueo crónico ET<sub>A</sub> o la activación ET<sub>B</sub>.

En principio estos resultados sugieren que la activación de los receptores ET<sub>A</sub> centrales podría modular a largo plazo el sistema catecolaminérgico en el BO derecho de los animales DOCA-sal, sin alterar el estado de dicho sistema en la hemiporción izquierda. Esta modulación ocurriría a nivel de la expresión, fosforilación y actividad de la TH, así como también mediante los niveles de su ARNm. Dado que los estudios agudos fueron realizados en el BO completo, sin subdividirlo en izquierdo y derecho, el estudio comparativo entre el corto y largo plazo de ambos receptores se hace muy complejo, lo cual nos priva de un análisis más profundo al respecto. A pesar de ello, la activación aguda del receptor ET<sub>B</sub> induce cambios en el BO que no se observan a tiempos más largos en ninguna de las hemiporciones (excepto en la expresión del ARNm de la TH en el BO derecho).

Previamente mencionamos que el BO se vincula, directa o indirectamente, con centros simpáticos y vasomotores en regiones diencefálicas y del tronco encefálico [16,33,34,397] y que la estimulación de esta área (o lesión) correlaciona con una desregulación de la descarga simpática, en algunos casos impactando sobre la PA [16,57,127]. Teniendo en cuenta que el modelo DOCA-sal presenta un tono simpático aumentado y la PA elevada, es posible que el BO (al menos la hemiporción derecha) podría participar de forma activa en el mantenimiento de una mayor descarga simpatoexcitatoria general en estos animales. Al igual que en el HP, los resultados actuales muestran que se requeriría necesariamente de la activación central de los receptores ET<sub>A</sub>. Mientras que el estímulo ET<sub>B</sub> parece tener efectos modulatorios de manera aguda pero no así a largo plazo.

Por otro lado, por trabajos anteriores contábamos con que no había diferencias entre el BO izquierdo y derecho de los animales normotensos en cuanto a la expresión, fosforilación y actividad de la TH, así como tampoco en la liberación de NA [161]. En el presente trabajo, la administración crónica de BQ-610 tanto como la de IRL1620 tampoco produjo alteraciones sobre los distintos factores de la TH estudiados en el BO (izquierdo o derecho) de las ratas Nt al ser comparadas con sus respectivos controles.

En resumen, la infusión crónica en animales conscientes muestra que el antagonista BQ-610 o el agonista IRL1620 no tendrían un efecto *per se* en la modulación del sistema catecolaminérgico del BO de los animales en condiciones fisiológicas normales. Por otro lado, en el modelo DOCA-sal no se observaron cambios en el BO izquierdo, pero sí un importante aumento de la actividad catecolaminérgica en el derecho, lo que podría

contribuir a una mayor descarga simpática. Esta respuesta parece ser mediada en el corto plazo por los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> centrales. Sin embargo, para mantener este estado a lo largo tiempo, sería fundamental la activación ET<sub>A</sub>. Por su parte, la activación central ET<sub>B</sub> no parece emular los efectos observados mediante el bloqueo ET<sub>A</sub>, al menos en el largo plazo.

### **5.2.3. Parámetros cardiovasculares.**

Como observamos, los receptores endotelinérgicos endógenos centrales inducen cambios a nivel del sistema catecolaminérgico, al menos en el HA, HP y el BO derecho de las ratas DOCA-sal. También mencionamos que una descarga simpática exacerbada podría llevar al aumento sostenido de la PAS. Por lo tanto, esta interacción entre estos dos sistemas sería un factor crucial en el mantenimiento de la hipertensión en el modelo DOCA-sal. Por estas razones, analizaremos los resultados obtenidos mediante el bloqueo a crónico ET<sub>A</sub> y la activación ET<sub>B</sub> central sobre la regulación de la PA y la FC.

Si bien el bloqueo central agudo de los receptores ET<sub>A</sub> en los animales normotensos provocó una leve disminución de la PAS [337], no se observaron alteraciones en este parámetro debido al tratamiento a largo plazo. Lo mismo ocurrió al comparar la activación crónica y aguda del receptor ET<sub>B</sub> [337]. Estos resultados indican que en animales normotensos tanto el BQ-610 como el IRL1620 administrados centralmente tendrían un leve efecto hipotensor a corto plazo que no se observa en tratamientos crónicos.

Por otra parte, la administración a largo plazo de BQ-610 redujo significativamente la PAS de manera sostenida en los animales DOCA-sal. En promedio, esta reducción fue de 29 mmHg a lo largo de la semana. Esto de alguna manera concuerda con lo observado durante los experimentos de infusión aguda, ya que allí también se había observado una disminución importante de la PAS [337]. Llamativamente, se encontraron signos de que este efecto podría ser dependiente de la dosis del antagonista ET<sub>A</sub>, ya que al duplicar la concentración administrada de la droga (24ng/h) la reducción fue aún mayor. En ese caso, la disminución promedió los 40 mmHg, mostrando una diferencia de 11 mmHg en comparación con el tratamiento anterior. Esto resulta interesante dado que el mismo tratamiento no mostró evidencias de una dosis-dependencia en la modulación del sistema catecolaminérgico en ninguna de las áreas centrales estudiadas. Por lo tanto, se podría pensar que existirían otros factores involucrados a nivel SNC de las ratas DOCA-sal que responden al estímulo endotelinérgico provocado. Si esto fuese así, la regulación central de la PAS en estos animales hipertensos también dependería otras variables, que hasta el momento no

podemos identificar y cuya respuesta sería diferente según la concentración de BQ-610 administrada. Posteriormente analizaremos este punto en mayor detalle imaginando cuáles podrían ser las causas de este efecto.

Por otro lado, el presente trabajo de tesis muestra que la activación crónica de los receptores ET<sub>B</sub> centrales también reduce la PAS en los animales hipertensos. En promedio a lo largo de la semana, tanto para las dosis de 45ng/h como para la de 90ng/h la disminución fue de 19 mmHg. Esto concuerda con lo observado a corto plazo mediante la administración aguda de IRL1620 ya que en esos experimentos la PAS también descendió significativamente [337]. Asimismo, es importante destacar que debido al tratamiento a largo plazo utilizando 45ng/h o 90ng/h no parece haber una dependencia de la dosis. Además, la disminución de la PAS observada en los animales DOCA-sal debido a la activación ET<sub>B</sub> no se mantuvo a lo largo del tiempo, dado que los valores alcanzados al final de la semana de tratamiento fueron similares a los de los controles hipertensos. Este dato resulta particularmente interesante ya que, al igual que lo observado en el hipotálamo y el BO de estas ratas DOCA-sal, la activación ET<sub>B</sub> parece tener efectos moduladores de manera aguda, pero los mismos dejan de evidenciarse en el largo plazo. Entonces, nos preguntamos: ¿la PAS depende de la modulación ejercida por parte de los receptores ET<sub>B</sub> centrales? La respuesta pareciera ser que sí, dado que vemos una disminución importante de este parámetro hemodinámico debido al tratamiento, con lo cual podríamos decir que tiene un efecto hipotensor emulando parcialmente la inhibición ET<sub>A</sub>. Sin embargo, con estos resultados no podemos deducir por qué esta modulación no se sostiene a lo largo del tiempo. Aun así, las alteraciones en la PAS provocadas por la activación ET<sub>B</sub> podrían ser, al menos en parte, a través de modulación del sistema catecolaminérgico de las áreas estudiadas en el presente trabajo, dado que a corto plazo también se observan alteraciones mediante la activación ET<sub>B</sub> que no se encuentra a largo plazo.

En cuanto a la FC, previamente encontramos que la infusión ICV aguda de BQ-610 produce un leve descenso de este parámetro dentro de la hora de tratamiento tanto en animales normotensos como hipertensos DOCA-sal [337]. Sin embargo, este efecto no se observa a largo plazo en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Tanto es así que no hubo diferencias significativas en la FC debido a los tratamientos a largo plazo con BQ-610 (12ng/h o 24ng/h) al ser comparados con sus respectivos controles Nt. Asimismo, a corto plazo la infusión ICV de IRL1620 también había disminuido la FC de los animales normotensos dentro de la hora de tratamiento, sin consecuencias sobre las ratas DOCA-sal

[337]. En cambio, a largo plazo la activación ET<sub>B</sub> no alteró este parámetro en ninguno de los grupos. Los valores de FC obtenidos en todos los grupos experimentales, ya sea con o sin la administración crónica de BQ-610 o IRL1620, sean normotensos o DOCA-sal, estuvieron dentro del rango de FC considerado normal en las ratas Sprague-Dawley [365,366]. Sería lógico pensar que ante un aumento de la PAS exista en contraposición, al menos en condiciones de normotensión, una respuesta de la FC modulada a través del mecanismo del barorreflejo llevando a una disminución de este parámetro. En las ratas DOCA-sal observamos un aumento sostenido de la PAS que no parece tener consecuencias sobre la FC, tal vez esto esté relacionado con que se demostró que en este modelo de HTA el mecanismo barorreflejo se encuentra alterado y que esta alteración precede al aumento de la PAS [149,370–373]. Asimismo, se reportó que las ETs podrían modular el barorreflejo atenuando su sensibilidad ante los cambios hemodinámicos [244,398]. Con lo cual sería posible no observar una respuesta de este factor debido al tratamiento DOCA-sal.

En resumen, los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> centrales no modularían el comportamiento a largo plazo de la FC tanto en animales normotensos como hipertensos. En cambio, ambos receptores estarían implicados en el mantenimiento de la PAS elevada en el modelo de HTA DOCA-sal, sin alterar a largo plazo este parámetro en las ratas normotensas. El funcionamiento del receptor ET<sub>A</sub> parece ser imprescindible en este sentido, dado que su inhibición disminuye la PAS de manera sostenida. Además, observamos que la PAS podría estar ligada a la dosis empleada del antagonista y que la regulación central de este parámetro hemodinámico dependería solo en parte de la interacción con el sistema catecolaminérgico del hipotálamo y el BO. Esto surge de que no se encontraron diferencias entre la administración central de 12ng/h de BQ-610 comparada con la de 24ng/h respecto de los distintos componentes de la TH estudiados, pero sí sobre la PAS. Esto implicaría que los efectos observados sobre este parámetro hemodinámico serían el resultado de un mecanismo más complejo, involucrando la participación de otros factores hasta ahora desconocidos. Por su parte el receptor ET<sub>B</sub> también tendría el mismo efecto hipotensor, pero la disminución de la PAS no es tan pronunciada como mediante el bloqueo ET<sub>A</sub>. Además, no parece ser dependiente de la dosis de IRL1620 y no se mantiene a largo plazo volviendo al estado encontrado en los animales hipertensos no tratados.

### 5.3. Discusión general.

A lo largo del presente trabajo de tesis hemos descripto y analizado los diferentes aspectos que conciernen al desarrollo y mantenimiento del modelo DOCA-sal. También evaluamos las respuestas de la inhibición central de los receptores ET<sub>A</sub> y la activación ET<sub>B</sub> a largo plazo sobre la regulación del sistema catecolaminérgico en el hipotálamo y el BO de ratas conscientes. Como vimos, esto fue realizado tanto en animales normotensos como hipertensos, siempre en comparación con antecedentes de nuestro y otros laboratorios. En este apartado discutiremos los puntos que fueron quedando pendientes durante el desarrollo de la tesis, así como también las consideraciones y limitaciones que hay que tener en cuenta a la hora de obtener conclusiones definitivas. Además, pondremos en contexto los hallazgos obtenidos en un panorama más amplio.

A través de nuestros resultados, los antecedentes de nuestro laboratorio y la bibliografía presentada, hemos visto que la HTA generada a través del modelo DOCA-sal produce un aumento sostenido de la PAS que parece no provocar cambios en la FC. Estas consecuencias correlacionan a su vez con el desarrollo de hipertrofia en el VI y con un aumento de ET-1 circulante. Además, como observamos en reiteradas oportunidades, el sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO derecho de los animales hipertensos se encuentra alterado de manera diferencial. Por un lado, encontramos que los distintos mecanismos de regulación de la TH, así como su propia actividad enzimática, se encuentran disminuidos en el HA en la HTA, lo cual sería un indicador de una menor actividad simpatoinhibitoria de esta región. Por el contrario, tanto en el HP como en el BO derecho se observa una actividad noradrenérgica exacerbada indicando que ambas áreas evocarían una respuesta simpatoexcitatoria. De esta manera, el balance general produciría una descarga simpática aumentada y todas estas condiciones serían fundamentales en el mantenimiento a largo plazo de la PAS en modelo DOCA-sal.

Para entender el papel de los receptores de las ETs en la modulación a largo plazo del sistema catecolaminérgico en estas áreas centrales y sus implicancias en el mantenimiento de la hipertensión DOCA-sal realizamos los experimentos crónicos de inhibición ET<sub>A</sub> con BQ-610 y activación ET<sub>B</sub> con IRL1620 en ratas conscientes tal y como fueron analizados anteriormente. Allí observamos que el BQ-610 y el IRL1620 no tendrían un efecto *per se* a largo plazo sobre el sistema catecolaminérgico de las áreas estudiadas en los animales en condiciones fisiológicas normales. La administración crónica de estas drogas tampoco

afectaría la PAS y la FC. Por el contrario, en los animales DOCA-sal la actividad catecolaminérgica aumentada en el HP y el BO, y disminuida en el HA, parece depender de la activación de los receptores ET<sub>A</sub> centrales, dado que el bloqueo durante 7 días revirtió estos parámetros a valores similares a los encontrados en los animales normotensos. Además, el mantenimiento de la PAS también parece estar ligado directamente a la actividad del receptor ET<sub>A</sub>, ya que se produjo una significativa y sostenida disminución debido al bloqueo crónico de este receptor.

Llamativamente, encontramos indicios de que la respuesta al BQ-610 podría variar según la dosis crónica administrada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que una de las importantes limitaciones del presente trabajo es la forma de administración tanto del antagonista ET<sub>A</sub> como del agonista ET<sub>B</sub>. En nuestros experimentos a largo plazo el BQ-610 (al igual que el IRL1620) fue infundido en el ventrículo lateral del cerebro actuando en aquellas áreas que presenten el receptor ET<sub>A</sub> (y ET<sub>B</sub> en el caso del IRL1620). Por un lado, sabemos que el HA, el HP y el BO expresan ambos receptores y que además la extensión del ventrículo alcanza estas regiones [79,128,337]. Asimismo, a lo largo de los 7 días de tratamiento es factible que las drogas alcancen estas áreas debido a que pueden ser distribuidas libremente mediante la microcirculación ventricular [399]. Se ha descrito que el LCR en la rata tiene un volumen aproximado de 300ul y un flujo circulatorio cercano a los 130ul/h. Así, el volumen completo del ventrículo lateral (~ 50ul) es reemplazado casi 3 veces en ese lapso de tiempo y además esta difusión podría ser asistida por el flujo ocasionado por la bomba osmótica que alcanza los 0,12ul/h [399]. En este contexto, decimos que esta es una de las principales limitaciones del trabajo, dado que no podemos asegurar que tanto el BQ-610 como el IRL160 actúen directamente en el HA, HP y el BO. Teniendo en cuenta las complejas conexiones entre las distintas regiones del cerebro no es ilógico pensar que el sistema catecolaminérgico en estas áreas pueda ser modulado por un efecto combinatorio con otras regiones centrales con las cuales compartan proyecciones eferentes y aferentes. En efecto, esto también pone de manifiesto que las consecuencias observadas a nivel hemodinámico seguramente son la resultante del accionar del HA, HP y el BO, así como también de otras áreas regulatorias. Por ejemplo, es posible que los resultados descriptos para el BO se hayan debido en parte a una respuesta a nivel del LC, el cual a su vez proyecta directamente a esta región telencefálica. Para poder saber si la respuesta es propia del BO o bien validar estas suposiciones sería ideal poder administrar localmente el BQ-610 o el IRL1620. Sin embargo, no hay que olvidar los resultados obtenidos en estudios previos en

donde demostramos un efecto directo sobre el BO en un modelo *ex-vivo* y que tanto el HP como el BO presentan una alta colocalización de los receptores de las ETs en neuronas TH positivas [212,260]. Esto último sugiere que tal vez la modulación del sistema catecolaminérgico central pueda ser directa, pero teniendo en cuenta la complejidad del SNC, las consecuencias sobre la PAS podrían ser más bien un efecto combinatorio. También hemos mencionado que el hipotálamo se encuentra altamente conectado con otras regiones y núcleos relacionados con la regulación central de la función cardiovascular, lo cual propicia el escenario para una respuesta concertada entre varias regiones. Estas suposiciones podrían explicar la respuesta dosis-dependiente de la PAS observada en los animales DOCA-sal debido al tratamiento con el antagonista ET<sub>A</sub>, donde pareciera que este parámetro no depende exclusivamente de la interacción entre el sistema endotelinérgico central y el catecolaminérgico de las regiones estudiadas, sino que las variaciones observadas implicarían la participación de otros factores. En todo caso, lo que si podemos afirmar es que directa o indirectamente, el receptor ET<sub>A</sub> modula el comportamiento del sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO de las ratas DOCA-sal. Además, ya sea también de forma directa a través de las áreas estudiadas o indirecta por la participación de otras regiones o mecanismos centrales, la participación del receptor ET<sub>A</sub> es fundamental para el mantenimiento a largo plazo de la PAS elevada, al menos, en este modelo de hipertensión sal dependiente.

Por otro lado, la activación central crónica de los receptores ET<sub>B</sub> nos permitió emular transitoriamente los resultados obtenidos mediante la inhibición ET<sub>A</sub>. Si bien el tratamiento a largo plazo con IRL1620 logró disminuir la PAS de los animales DOCA-sal (sin cambios en la FC) esta reducción fue menor que con BQ-610. Además, en estos experimentos los efectos de la activación crónica ET<sub>B</sub> se pierden al final de la semana de tratamiento, reestabliéndose la PAS a valores similares a los de los controles DOCA-sal. Asimismo, el sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO de estos animales no parece responder en el largo plazo de manera importante. Esta observación surge de no haber encontrado diferencias significativas en los diferentes mecanismos regulatorios de la TH debido al tratamiento a largo plazo con IRL1620. La única excepción ocurrió en el BO derecho donde los niveles del ARNm mostraron una disminución, pero solamente debido a una dosis crónica de 90ng/h del agonista. Es pertinente detenerse en este punto para analizar otra de las limitaciones del presente trabajo, la cual es desconocer el estado del sistema catecolaminérgico de las áreas centrales estudiadas en los estados intermedios entre las

24hs y las 144hs de tratamiento crónico, ya sea con BQ-610 o IRL1620. Esto resulta particularmente importante en relación con la implicancia del receptor  $ET_B$  en este estudio, dado que permitiría explicar si la ausencia de cambios en la PAS de los animales DOCA-sal a las 144hs de tratamiento se debe (directa o indirectamente) a la falta de respuesta del sistema catecolaminérgico en ese momento. Sería interesante poder conocer el estado del sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO al menos entre las primeras 24-48hs, que es dónde la disminución de la PAS fue más pronunciada. Si pensamos más allá de los límites del trabajo, si en ese momento los distintos factores estudiados de la TH reaccionaran de similar manera a lo observado a través del bloqueo  $ET_A$  podríamos suponer que el receptor  $ET_B$  estaría actuando de manera contrapuesta al primero implicando que ambos receptores estarían fuertemente involucrados en el mantenimiento de la PA en el modelo DOCA-sal. No obstante, estas suposiciones deberán ser tenidas en cuenta para experimentos futuros.

Por el momento deberemos respaldarnos en las diferencias encontradas mediante el cotejo con los experimentos a corto plazo *ex-vivo* y agudos *in-vivo*. Anteriormente pudimos ver que debido a la activación aguda  $ET_B$  se producen algunas alteraciones de manera diferencial en las distintas áreas estudiadas. Sin embargo, estos cambios no logran observarse al final de los experimentos crónicos. Los tratamientos agudos también provocaron la disminución de la PAS. Esto de alguna manera deja entrever que la activación  $ET_B$  emula parcialmente la respuesta encontrada mediante el bloqueo  $ET_A$ , dado que en ambos casos disminuye la PAS y al menos basados en los datos a corto plazo modula el comportamiento del sistema catecolaminérgico en las regiones centrales estudiadas. En estas circunstancias, lo máximo que podemos afirmar es que, por lo visto a corto plazo, el receptor  $ET_B$  modularía (directa o indirectamente) el comportamiento del sistema catecolaminérgico en el HA, HP y el BO de las ratas DOCA-sal. Además, podríamos decir que la activación del receptor  $ET_B$  repercute en el mantenimiento de la PAS elevada este modelo de hipertensión sal dependiente. Sin embargo, los efectos que este receptor ejerce sobre todos los parámetros estudiados parecen perderse a largo plazo. Ante esta situación nos planteamos la siguiente pregunta: ¿cuál es el motivo para que esta situación no se sostenga crónicamente y/o qué mecanismos compensatorios estarían actuando para aplacar la respuesta de activación  $ET_B$ ?

Ante este interrogante podríamos pensar que tal vez, que de alguna forma la activación crónica lleve a que los receptores  $ET_B$  se desensibilicen y/o internalicen. Aunque

no contamos con evidencias propias para afirmar ninguna de estas suposiciones, algunos reportes sustentarían la idea de desensibilización y/o internalización de los receptores.

Si bien hasta el momento no hemos encontrado publicaciones que refieran casos de desensibilización o internalización debido a una sobreactivación de los receptores ET<sub>B</sub> a nivel SNC, este fenómeno no es algo fuera de lo común, especialmente en los receptores acoplados a la proteína G [400]. En general estos eventos llevan a una disminución de hasta el 80% de las respuestas y en algunos casos a la inhibición de las mismas [400]. Al respecto, se ha demostrado que la activación crónica mediante agonistas de esta familia de receptores desencadena mecanismos de feedback que llevan a una desensibilización e internalización de la respuesta mediante el desacople de la proteína G por fosforilación [400,401]. Además, se ha demostrado que este fenómeno también ocurre a nivel del SNC, aunque como mencionamos recién, no sabemos si esto le ocurre específicamente al receptor ET<sub>B</sub> [402]. Aun así, el sistema endotelinérgico no escapa a esta situación, ya que se reportó que este mecanismo también afecta a los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> tanto en cultivo de células humanas como en tejidos de ratas [403–405]. Al respecto, se demostró que ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> median respuestas cronotrópicas negativas y positivas, respectivamente, en la aurícula derecha de ratas y que la administración repetitiva de ET-1 lleva a la desensibilización de los receptores y a la pérdida de estos efectos [405]. Interesantemente, varios trabajos publicados por Cramer y col. muestran que la estimulación de ET<sub>A</sub> con ET-1 lleva a una activación parcialmente sostenida de este receptor, mientras que el receptor ET<sub>B</sub> se desensibiliza rápidamente perdiendo el 80% de su actividad luego de la aplicación del agonista [406,407]. En estos trabajos se demostró que la inactivación ET<sub>B</sub> ocurre mediante un subtipo de fosforilación que no se da en ET<sub>A</sub> y que esto no afecta la cinética de internalización siendo similar entre ambos receptores [406,407]. El primero de los trabajos culmina sugiriendo que la modulación subtipo-específica de los receptores de ETs podría explicar los efectos hipotensores agudos de las ETs a través de la actividad a corto plazo de los receptores de ET<sub>B</sub> y los efectos hipertensivos de larga duración debido a la activación sostenida de ET<sub>A</sub> [406]. En el trabajo posterior proponen que en el sistema cardiovascular de la rata, la ET-1 provoca respuestas fisiológicas prolongadas a través del receptor ET<sub>A</sub>, mientras que los efectos mediados por el ET<sub>B</sub> son transitorios [407]. Por lo tanto, apoyados en estos datos bibliográficos no podemos descartar la posibilidad de que la activación a largo plazo de los receptores ET<sub>B</sub> centrales lleve a una desensibilización de estos, y tal vez también

a su internalización, lo que de alguna manera explicaría los efectos encontrados en los tratamientos crónicos con IRL1620.

Desde otro ángulo, pero en el mismo sentido, en nuestro laboratorio postulamos la hipótesis de que podría existir un efecto de desplazamiento de las ETs centrales circulantes debido a los tratamientos con el antagonista ET<sub>A</sub> o el agonista ET<sub>B</sub>. Esta idea plantea que ante el bloqueo central de los receptores ET<sub>A</sub>, las ETs solo podrían actuar a través de los receptores ET<sub>B</sub> provocando la activación de estos últimos, lo que en definitiva llevaría a los efectos observados en el sistema catecolaminérgico, la descarga simpática y las consecuencias sobre la PAS. Si esto fuese así, en el mantenimiento de la PA elevada en los animales DOCA-sal se requeriría tanto de la activación ET<sub>A</sub> como de una actividad ET<sub>B</sub> disminuida (o al menos basal). Este tipo de efectos no es algo inusual, dado que se ha reportado que el bloqueo ET<sub>A</sub> en la pituitaria anterior aumentaría las ETs a nivel paracrino pudiendo de esta manera unirse al ET<sub>B</sub> libre [408]. Esta idea de desplazamiento del ligando hacia el otro receptor por administración de un bloqueante se sustenta entonces en este tipo de antecedentes y en las afinidades de los receptores por las ETs. En este sentido, se ha visto que tanto ET<sub>A</sub> como ET<sub>B</sub> presentan afinidades similares por ET-1 [409].

Si nuestra hipótesis fuese correcta, podría suceder algo similar durante la activación crónica ET<sub>B</sub>. En este caso las ETs circulantes se verían desplazadas hacia los receptores ET<sub>A</sub> quedando de esta manera ambos activados. Mas aun, esta posibilidad podría provocar una sobreactivación ET<sub>A</sub>. Inicialmente esta situación podría explicar los efectos de la activación con IRL1620 sobre en el sistema catecolaminérgico a corto plazo y en la disminución (de menor amplitud) de la PAS. Suponiendo que, si de alguna manera la activación ET<sub>B</sub> dejase de tener efecto, por ejemplo, como mencionamos antes, por algún mecanismo de desensibilización de estos receptores, las ETs centrales circulantes continuarían actuando solamente sobre ET<sub>A</sub>. Esto podría dar una idea de por qué a largo plazo no se observan alteraciones sobre el sistema catecolaminérgico de las áreas estudiadas, así como tampoco sobre la PAS. Claramente estas deducciones están por fuera de los límites del presente trabajo y hasta el momento no tenemos evidencias contundentes que las respalden. Sin embargo, estas conjeturas permiten sugerir nuevas hipótesis para poder investigar en el futuro la naturaleza de este comportamiento irregular del receptor ET<sub>B</sub>.

En virtud de ello, previamente reportamos que los receptores ET<sub>B</sub> centrales, actuarían activando la vía del ON con lo cual sería interesante indagar sobre el estado de la enzima nNOS, comenzando por las áreas estudiadas. Por ejemplo, si durante inhibición crónica ET<sub>A</sub>

los niveles de la nNOS estuviesen aumentados tendríamos un primer indicador de que este tratamiento llevaría a una activación paralela del receptor ET<sub>B</sub>, muy probablemente por las ETs centrales circulantes. Asimismo, y dado que no existe un agonista específico ET<sub>A</sub>, también sería útil realizar estos experimentos a largo plazo utilizando el BQ-610 en combinación con el IRL1620, de esta forma activaríamos el receptor ET<sub>B</sub> mientras que las ETs circulantes no podrían actuar sobre ET<sub>A</sub>. Creeríamos así, que la inhibición ET<sub>A</sub> y la activación ET<sub>B</sub> también provocaría una disminución de la PAS y cambios acordes a los observados en el sistema catecolaminérgico. Si los receptores ET<sub>B</sub> de alguna forma dejaran de ser funcionales (por ejemplo: desensibilización) estaríamos ante una nueva situación donde ambos receptores estarían “silenciados”. En este caso no podríamos anticipar como reaccionaría el sistema, pero con seguridad ofrecería resultados que podrían complementar la información disponible hasta el momento. Así, como contrapartida también podríamos usar dos antagonistas específicos combinados, por ejemplo, BQ-610 (para ET<sub>A</sub>) y BQ-788 (para ET<sub>B</sub>). Entonces, si la inhibición ET<sub>A</sub> llevase a la activación ET<sub>B</sub> por parte de las ETs circulantes, esperaríamos que el doble bloqueo evite estas alteraciones. En definitiva, esto nos permitiría confirmar que los cambios en el sistema catecolaminérgico observados en los animales DOCA-sal dependerían tanto de la activación ET<sub>A</sub> como de mantener los niveles basales o disminuidos de los ET<sub>B</sub>. De más está decir que todas estas posibilidades son parte de las ideas que podrían llevarnos a encontrar una explicación de los resultados observados respecto de la implicancia de los receptores ET<sub>B</sub> centrales en este trabajo de tesis doctoral.

En otro orden de ideas, en diferentes trabajos hemos propuesto que el BO podría participar en la regulación central de la función cardiovascular como un área simpatoexcitatoria a través de la modulación del sistema catecolaminérgico. Además, observamos que también podría estar implicado en el mantenimiento de la PAS elevada en la hipertensión del modelo DOCA-sal. Esta idea surge de las múltiples conexiones que esta región telencefálica tiene con los distintos núcleos del SNC involucrados en los mecanismos antes enumerados y de la creciente evidencia aportada por nuestro laboratorio en ese sentido. De hecho, el presente estudio junto con los antecedentes anteriores, son los primeros en presentar pruebas del papel del BO en la HTA DOCA-sal [161,337]. Además, hemos dedicado una parte de la introducción a sustentar bibliográficamente la existencia de asimetrías tanto anatómicas como funcionales en el SNC ya que volvimos a confirmar un comportamiento desigual entre las hemiporciones derecha e izquierda del BO, esta vez en experimentos llevados a cabo en animales conscientes. Los detalles de la respuesta fueron

explicados en reiteradas oportunidades, remarcando que fue la hemiporción derecha la que presentó los cambios más importantes. Fundamentalmente, se observó que la activación de los receptores ET<sub>A</sub> centrales es necesaria para mantener elevados todos los parámetros estudiados de la TH en el BO derecho y que, de alguna manera, por todo lo explicado anteriormente, el receptor ET<sub>B</sub> pareciera también estar implicado. En este contexto, entendemos que hay apoyo en nuestros estudios y en la literatura para sugerir que el BO puede contribuir a la elevación de la PA de manera crónica en este modelo animal de HTA, lo que en definitiva nos permite hipotetizar que también podría desempeñar un papel en la hipertensión humana.

Desde ese punto de vista, en principio, sería lógico pensar que el BO pueda tener una importancia menor en los seres humanos que en las ratas. Sin embargo, y de acuerdo con la literatura, el BO no juega un papel menos significativo en este sentido [410–414]. Estudios exhaustivos sobre la morfología cerebral en diferentes especies han demostrado que, en general, el tamaño de cualquier región del cerebro es proporcional la magnitud del cerebro entero y aunque el volumen total puede explicar más del 96% de la varianza en el tamaño de cada área individual, esto no aplica al BO. La dimensión del BO es independiente del tamaño de la mayoría de las regiones cerebrales. Los teóricos evolutivos modernos consideran esto como uno de los tres principios de escalado del cerebro: 1- alta correlación de los volúmenes de las estructuras; 2- existencia de una escala alométrica diferente para cada estructura; 3- independencia relativa del sistema olfativo-límbico del resto del cerebro. Si bien el tamaño relativo del BO respecto del cerebro en primates, incluidos los humanos, es del 0.01% y en roedores es del 2-4%, el tamaño absoluto del BO humano es significativamente mayor (~ 60 mm<sup>3</sup> en humanos vs ~ 27 mm<sup>3</sup> en ratas). Además, se ha demostrado que este volumen varía con la edad, en situaciones patológicas como la hiposmia (reducción del ~ 25%) o en casos de personas que sufrieron abuso infantil (reducción ~ 20%). También se ha comprobado que el sistema olfativo humano es altamente sensible a una amplia variedad de olores y también puede ejercer una gran influencia en el comportamiento, la fisiología y las emociones.

Los estudios en humanos sanos muestran que el BO no solo está involucrado en el olfato, sino que también en otras funciones fisiológicas e incluso en diversas patologías. De acuerdo con esto, se demostró que la pérdida de olfato en humanos se correlaciona con un mayor consumo de sal, lo que aumenta el riesgo de HTA [415]. Estos pacientes refieren que sienten deseos de comer alimentos salados. Uno podría pensar que está relacionado con la

imposibilidad de poder sentir el gusto de la comida, pero también se comprobó que el aumento en el consumo de sal no está asociado con cambios en la detección del sabor [416]. Otros estudios muestran que la disfunción olfativa es una manifestación temprana de la enfermedad de Parkinson y que esto estaba relacionado con la disfunción simpática y parasimpática cardíaca y también con el deterioro simpático vascular [417]. Además, también se ha observado que la disfunción olfativa tiene una fuerte presencia en otras enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o congénitas como el síndrome de Kallmann [418–422].

Asimismo, muchos trabajos respaldan una estrecha relación entre las enfermedades cardiovasculares y la depresión, y también entre la depresión y el BO [423,424]. Como mencionamos en la introducción a este trabajo de tesis, la bulbectomía bilateral es utilizada como un modelo animal de depresión que exhibe cambios significativos en la descarga simpática y la función cardiovascular [127]. De hecho, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la ablación del BO impide la elevación de la PA en los animales DOCA-sal (resultados no publicados). Asimismo, se demostró que los pacientes con depresión presentan un BO de volumen reducido [425–427] y exhiben una menor sensibilidad olfativa, sin afectar la capacidad de identificar y discriminar olores. También se observó que estos pacientes son más propensos a desarrollar enfermedades cardiovasculares y tienen una tasa de mortalidad más alta que la población general, no necesariamente relacionada con causas como el suicidio [428]. Se estima que la prevalencia de depresión en pacientes con enfermedades cardiovasculares oscila entre el 15 y el 20%. En este sentido, un estudio mostró que la depresión predijo un aumento del 70% en la probabilidad de infarto agudo de miocardio [130]. También se vio que el cuadro depresivo estaba presente en aproximadamente el 20% de los pacientes con accidente cardiovascular y que esta situación los coloca en un mayor riesgo de episodios futuros. No obstante, es importante señalar que casi el 30% de estos pacientes fueron diagnosticados clínicamente como depresivos antes del episodio cardiovascular. Los estudios etiológicos sugieren que la depresión podría duplicar el riesgo de nuevas enfermedades cardiovasculares [429]. Además, se halló que la prevalencia de depresión en pacientes hipertensos llega al 40%, y es más alta en mujeres (63,4%) que en hombres (36,6%). Como se muestra en la literatura, en los últimos años la relación entre la depresión y el BO ha adquirido mayor relevancia, así como también el vínculo de ambos frente al riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Por otro lado, previamente detallamos la complejidad e importancia de la HTA junto con su elevada prevalencia, su avance progresivo y silencioso ocasionando a largo plazo daño en los órganos blanco. También resaltamos su alta tasa de mortalidad derivada de accidentes cerebrovasculares, renales o cardiovasculares. Asimismo, nos explayamos acerca de la importancia del consumo elevado de sodio y otros múltiples factores intervinientes que dificultan su estudio, prevención y tratamiento. En consecuencia, en función de lo discutido hasta el momento y teniendo en cuenta que los receptores acoplados a la proteína G han demostrado ser los más favorables como blancos de acción de fármacos en la medicina moderna [402], podríamos pensar que drogas que tienen como objetivo los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> podrían ser útiles agentes terapéuticos para el tratamiento de la HTA. Un punto importante para tener en cuenta sería que tengan tropismo por el SNC para evitar los efectos periféricos no deseados que estas drogas pudiesen ocasionar. Si bien podría resultar prematuro plantear algún tipo de aplicación sin más estudios experimentales y clínicos, se ha observado que tanto los antagonistas específicos ET<sub>A</sub> como los mixtos (ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>) reducen de manera eficaz la PA en modelos de HTA que van acompañados de incrementos de ET-1 [430]. Es interesante recordar que el modelo DOCA-sal presenta esta endotelina incrementada a nivel periférico [53,168,171] y además, sus efectos vasopresores parecen depender del sodio ya que se observó que ET-1 sólo aumenta la PA cuando es acompañada de una dieta elevada de sal [168,170,431].

La FDA (de su nombre en inglés: *Food and drug administration*) aprobó el uso comercial de antagonistas ET<sub>A</sub> o mixtos ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> (Bosentan, Darusentan, Ambrisentan) para tratamientos en HTA resistente (aquella que no responde a múltiples tratamientos antihipertensivos) e hipertensión pulmonar. Sin embargo, ante la presencia de algunos efectos adversos su uso quedó limitado a un rango más reducido de pacientes. Aun así, las investigaciones apuntan a mejorar la administración de drogas cuyo blanco sea el receptor ET<sub>A</sub> dado que hasta el momento presentaría los resultados más satisfactorios [432].

Si bien este es uno de los motivos por el cual resulta importante estudiar más en detalle los mecanismos implicados en el mantenimiento de la HTA sal dependiente a través de la implicancia de los receptores ET<sub>A</sub> centrales, no habría que dejar de lado los receptores ET<sub>B</sub>. En este sentido, se han demostrado muchos efectos beneficiosos a través de la estimulación de estos receptores. Por ejemplo, a nivel periférico su respuesta vasodilatadora mediada por el ON tendría efectos benéficos en el tratamiento de la HTA, ya que facilitaría la eliminación renal de sodio. Además, se ha observado que la estimulación

central de ET<sub>B</sub> con ET-3 potencia la sensibilidad de un canal de sodio a nivel del SFO, lo que reduciría las concentraciones de dicho ion en el líquido extracelular y disminuiría el apetito por la sal [182]. Por lo tanto, la administración central de agonistas ET<sub>B</sub> podría ser útil sobre individuos hipertensos que presenten elevado consumo de sodio en la dieta.

Es importante destacar que se han realizados pocos estudios sobre el empleo de agonistas ET<sub>B</sub> en el tratamiento de la HTA y que, además de los trabajos de infusión aguda, no existen antecedentes bibliográficos donde se administre un agonista específico ET<sub>B</sub> centralmente a animales hipertensos y se determinen parámetros hemodinámicos. Es por esto que través del trabajo de la Dra. Guil que propusimos por primera vez que la administración de agonistas ET<sub>B</sub> con blanco de acción en el SNC, podrían ser una alternativa terapéutica en individuos con desregulación del sistema cardiovascular [337]. Claro está que, antes de plantear esta posible aplicación, queda pendiente la necesidad de tratar de comprender por qué la activación ET<sub>B</sub> tiene efectos agudos sobre la PAS que a largo plazo parecen perderse.

De modo que, a la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, de acuerdo con la bibliografía y los antecedentes de nuestro laboratorio, proponemos que:

La HTA DOCA-sal sería mantenida a largo plazo, al menos en parte, por el sistema endotelinérgico endógeno central. Este sistema potenciaría la actividad catecolaminérgica en regiones como el HP y el BO derecho, y la disminuiría en el HA. En su conjunto esto llevaría a una mayor descarga simpática lo cual sería uno de los factores clave en el mantenimiento de la PAS elevada en este modelo sal dependiente.

Por todo lo discutido, consideramos que esta tesis aporta nuevos conocimientos sobre la implicancia a largo plazo del sistema endotelinérgico en la HTA sal dependiente, abriendo un nuevo campo de estudio sobre las posibles ventajas terapéuticas de encontrar nuevos antagonistas ET<sub>A</sub> o agonistas ET<sub>B</sub> con acción específica en el SNC. Además, tanto por lo demostrado en el presente trabajo como en estudios anteriores, es importante destacar que nuestro grupo de investigación es de los primeros en encontrar una relación del BO con la regulación central de la función cardiovascular en animales hipertensos. Asimismo, destacamos que el BO actuaría de manera asimétrica, resaltando el papel de la hemiporción derecha de dicha región telencefálica. De esta manera, no solo hemos podido desentrañar algunas implicancias a largo plazo de los receptores endotelinérgicos, sino que también agregamos un nuevo actor al complejo mecanismo de la regulación central de la función

cardiovascular con posibles implicancias tanto en condiciones normales como patológicas. No obstante, aún queda mucho por investigar acerca de la fisiología cardiovascular y la HTA, particularmente también para poder obtener mayor certeza acerca de los mecanismos estudiados en la presente Tesis Doctoral.

---

## 6. Conclusiones

---

En el presente trabajo de tesis doctoral evidenciamos la importancia del sistema endotelinérgico endógeno central en el mantenimiento de la PAS en las ratas DOCA-sal. Es así como en estos animales el bloqueo a largo plazo del receptor  $ET_A$ , utilizando el antagonista específico BQ-610, llevó a un marcado y sostenido descenso de la PAS, sin cambios en la FC. De una manera similar, la activación crónica de los receptores  $ET_B$  centrales, utilizando el agonista específico IRL1620, también produjo una disminución de la PAS, aunque de menor intensidad y de manera transitoria. Esto contribuye al conocimiento actual mostrando que a nivel central los receptores  $ET_A$  tendrían una respuesta presora, mientras que los  $ET_B$  actuarían de forma contraria. Por otro lado, también es interesante destacar que estas alteraciones ocurrieron exclusivamente en las ratas DOCA-sal, dado que no se observaron cambios debido a los tratamientos crónicos en las normotensas, lo cual también expuso la existencia de un tono basal exacerbado del sistema endotelinérgico central en este modelo. Todo esto evidenció que la participación de los receptores  $ET_A$  centrales es fundamental en este sentido. Asimismo, es importante destacar que por primera vez estos experimentos fueron realizados a largo plazo, durante 7 días y en animales conscientes, lo cual nos permitió observar los efectos directos de las drogas en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

Como vimos, los hallazgos a nivel hemodinámico estuvieron ligados a los cambios observados a nivel central. Esto surge de haber evaluado los distintos pasos de la regulación de la TH, la enzima clave en la biosíntesis de catecolaminas, como marcador del estado del sistema catecolaminérgico en diferentes áreas del SNC. En este sentido, elegimos el HA y el HP dado que está demostrada la participación de ambas regiones en la modulación de la descarga simpática con efectos sobre la fisiología cardiovascular. También decidimos incluir en el estudio un área poco estudiada como el BO, dado que creemos que podría tener un papel similar en este sentido. En efecto, encontramos una mayor activación del sistema catecolaminérgico tanto en el HP como en el BO derecho, lo cual se vio acompañado de una mayor actividad enzimática. También observamos que el tratamiento DOCA-sal aumenta los niveles transcripcionales del mensajero de la TH en estas áreas. Por el contrario, el HA respondió de manera opuesta. La importancia de los receptores  $ET_A$  en la modulación del sistema catecolaminérgico en estas regiones centrales quedó evidenciada durante el

tratamiento con su antagonista, dado que el bloqueo crónico logró revertir estos parámetros, en líneas generales, a los niveles encontrados en los animales normotensos. En su conjunto, estos resultados serían indicadores de una menor actividad simpatoinhibitoria por parte de HA y una mayor actividad simpatoexcitatoria tanto en el HP como en el BO derecho. Esto en definitiva propiciaría un aumento de la descarga simpática, lo que sería fundamental para el mantenimiento a largo plazo de la PAS en el modelo DOCA-sal. Por su parte la activación crónica de los receptores ET<sub>B</sub> parece no tener efectos a largo plazo sobre el sistema catecolaminérgico en estas áreas. No obstante, hay que tener en cuenta nuestros antecedentes en experimentos *ex-vivo* y los tratamientos agudos con el mismo agonista dado que a corto plazo sí se observaron alteraciones significativas sobre la regulación de la TH. Por un lado, hemos hipotetizado que debido a la activación continua de los receptores ET<sub>B</sub> podría existir un efecto de desensibilización de estos. Por otro lado, también sugerimos que habría un desplazamiento de las ETs durante los experimentos con IRL1620 y BQ-610. Ambas inferencias podrían dar una explicación acerca del comportamiento irregular observado durante la activación central de los receptores ET<sub>B</sub>. Por supuesto, para validar estas hipótesis se requiere de la realización de nuevos experimentos que permitan entender mejor los detalles de este mecanismo.

La elevada susceptibilidad de este modelo sal dependiente a los tratamientos crónicos también lleva a pensar que el desarrollo de nuevos antagonistas ET<sub>A</sub> (más comúnmente empleados) o agonistas ET<sub>B</sub> (poco estudiados), fármaco-modulados y con tropismo hacia el SNC, podría tener importantes repercusiones a nivel terapéutico.

Por otra parte, a través de este trabajo y los antecedentes de nuestro laboratorio, continuamos sumando evidencias que indican una participación del BO, al menos en parte y de manera asimétrica, en la regulación central de la PA en los animales DOCA-sal, agregando un nuevo actor a este complejo mecanismo.

Finalmente, somos conscientes de que aún resta mucho trabajo de investigación por delante. Por esta razón, continuaremos trabajando en vistas de lograr nuevos avances en el estudio de la interacción entre el sistema endotelinérgico endógeno central y la actividad catecolaminérgica, así como también en sus consecuencias sobre la regulación de la fisiología cardiovascular y en la hipertensión arterial.

---

## 7. Perspectivas

---

A lo largo de esta Tesis Doctoral fuimos mencionando distintas estrategias experimentales que ayudarían a profundizar las conclusiones obtenidas hasta el momento.

Por un lado, remarcamos la necesidad de poder distinguir claramente a través de cuál o cuáles receptores se logran las modificaciones observadas en el sistema catecolaminérgico en las regiones centrales estudiadas. Esto surge ante la posibilidad de que debido al bloqueo  $ET_A$  ocurra un desplazamiento de las ETs circulantes que lleven a la activación de los receptores  $ET_B$  o, por el contrario, que la activación  $ET_B$  lleve paralelamente a la activación  $ET_A$ . En virtud de ello nos preguntamos si los efectos observados eran a través de la inhibición  $ET_A$ , de la activación  $ET_B$  o de una acción conjunta. De modo que creemos que sería interesante poder analizar el estado de la nNOS (actividad y expresión) en las áreas estudiadas, ya que como mencionamos anteriormente se ha reportado que, centralmente, la activación de esta vía es mediante  $ET_B$ . De esta forma, si durante el bloqueo  $ET_A$  las ETs circulantes activan  $ET_B$  deberíamos encontrar un aumento en la actividad de la nNOS. Desde otro punto de vista, también propusimos utilizar ambas drogas (BQ-610 e IRL1620) de manera conjunta en experimentos crónicos y como contrapartida también hacerlo con dos antagonistas específicos combinados como BQ-610 (para  $ET_A$ ) y BQ-788 (para  $ET_B$ ). Entonces, esperaríamos que el doble bloqueo evite estas alteraciones. En definitiva, esto nos permitiría saber si se requiere o no de una baja (o basal) actividad  $ET_B$  para el mantenimiento de la actividad catecolaminérgica alterada en los animales DOCA-sal. Asimismo, se útil evaluar los niveles de expresión de los receptores  $ET_A$  y  $ET_B$  al final de los distintos tratamientos crónicos para saber si hubo alguna alteración. Esta idea surgió a lo largo del actual trabajo de tesis, pero por cuestiones de tiempo aún no se han llevado a cabo.

Por otra parte, también mencionamos que al final de la activación a largo plazo de los receptores  $ET_B$  centrales no se observaron diferencias significativas en la PAS y en los componentes estudiados de la TH en comparación con los controles DOCA-sal. Por lo tanto, sería muy útil conocer el estado del sistema catecolaminérgico de estos animales a tiempos intermedios (por ejemplo, entre las 24 y 48hs). Esto nos permitiría saber si la disminución de la PAS a lo largo del experimento con IRL1620 correlaciona (directa o indirectamente) con cambios en la expresión y actividad de la TH.

En otro orden de ideas, también debemos tener en cuenta que uno de los factores de elevada importancia en el establecimiento de la HTA es el estado oxidativo y el proceso inflamatorio, con lo recientemente hemos desarrollado una nueva línea de investigación al respecto. En este aspecto, se sabe que las ETs incrementan las especies reactivas del oxígeno (ROS) alterando el estado redox de la célula [398]. Por otra parte, el NPV es un importante centro coordinador y regulador de la respuesta autonómica. Asimismo, la actividad simpática regulada por el NPV depende de un fino balance entre diferentes neurotransmisores a nivel de dicha región. En este contexto, nos planteamos si el sistema endotelinérgico central estaría regulando la PAS, y la hipertrofia cardíaca, a través de un desbalance de neurotransmisores y de la activación del circuito entre moléculas proinflamatorias y de las ROS a nivel del NPV en el modelo DOCA-sal. Actualmente, la Dra. Guil lleva adelante esta línea de investigación como parte de su trabajo postdoctoral.

Finalmente, producto del presente trabajo de tesis, hemos encontrado algunos resultados interesantes respecto del desarrollo de hipertrofia del VI en los animales DOCA-sal. Sorprendentemente, debido al bloqueo a largo plazo de los receptores ET<sub>A</sub> centrales se encontró que los valores del IHVI en los animales hipertensos tratados no diferían de los hallados en los controles Nt y que además eran significativamente menores que en los controles DOCA-sal. Por el contrario, la activación crónica ET<sub>B</sub> no tuvo efecto en este sentido. A la vista de los resultados, no sabemos si lo visto debido al bloqueo ET<sub>A</sub> podría tratarse de una posible reversión o un impedimento del desarrollo de hipertrofia del VI. Además, tampoco sabemos si esto sería un efecto directo del bloqueo ET<sub>A</sub> o de la disminución sostenida de la PAS a lo largo de la semana de tratamiento. Como se puede observar son muchos los interrogantes que surgieron a partir de estos novedosos resultados. Por esta razón, a lo largo del trabajo de tesis se fueron realizando preparados de cortes de corazón a la altura de los ventrículos para utilizarlos en microscopía. Esto fue realizado tanto para los animales normotensos como para los hipertensos DOCA-sal, ya sean estos tratados, o no, con BQ-610 o IRL1620. El objetivo es, por un lado, validar los resultados obtenidos mediante el IHVI, dado que, si bien es un fuerte indicador, no es suficiente para asegurar que lo observado sea efectivamente el desarrollo de hipertrofia. Por otro lado, investigar esta nueva línea derivada de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. En consecuencia, se realizaron preparados de microscopía con tinciones de hematoxilina-eosina y sirius red para estudiar el diámetro de los miocitos y el contenido de colágeno como marcadores de hipertrofia, respectivamente. Además, se reservaron cortes en parafina para

estudiar otros marcadores mediante inmunohistoquímica. Asimismo, sería interesante conocer el estado del corazón en el momento previo al tratamiento crónico con el antagonista ET<sub>A</sub> y el agonista ET<sub>B</sub> ya que de esa manera podríamos discriminar si los efectos observados se tratan de una reversión o si se previene el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.

## Abreviaturas

|                       |                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>AC</b>             | Adenilato ciclasa                                                    |
| <b>AHA</b>            | Área hipotalámica anterior                                           |
| <b>Ang-II</b>         | Angiotensina II                                                      |
| <b>AOB</b>            | Bulbo olfatorio accesorio ( <i>accessory olfactory bulb</i> )        |
| <b>BO</b>             | Bulbo olfatorio                                                      |
| <b>BPM</b>            | Latidos por minuto ( <i>beats per minute</i> )                       |
| <b>BQ-610</b>         | Antagonista del receptor ET <sub>A</sub>                             |
| <b>DOCA</b>           | Acetato de 11-deoxicorticosterona                                    |
| <b>EPL</b>            | Capa externa plexiforme ( <i>plexiform external layer</i> )          |
| <b>ET-1</b>           | Endotelina 1                                                         |
| <b>ET-2</b>           | Endotelina 2                                                         |
| <b>ET-3</b>           | Endotelina 3                                                         |
| <b>ET<sub>A</sub></b> | Receptor de endotelinas tipo A                                       |
| <b>ET<sub>B</sub></b> | Receptor de endotelinas tipo B                                       |
| <b>ETs</b>            | Endotelinas                                                          |
| <b>FC</b>             | Frecuencia cardiaca                                                  |
| <b>GABA</b>           | Ácido γ-aminobutírico                                                |
| <b>GCL</b>            | Capa de células granulocíticas ( <i>granulocytic cell layer</i> )    |
| <b>GL</b>             | Capa glomerular ( <i>glomerular layer</i> )                          |
| <b>HA</b>             | Hipotálamo anterior                                                  |
| <b>HP</b>             | Hipotálamo posterior                                                 |
| <b>HTA</b>            | Hipertensión arterial                                                |
| <b>ICV</b>            | Intracerebroventricular                                              |
| <b>IHVI</b>           | Índice de hipertrofia del ventrículo izquierdo                       |
| <b>IPL</b>            | Capa interna plexiforme ( <i>inner plexiform layer</i> )             |
| <b>IRL1620</b>        | Agonista del receptor ET <sub>B</sub>                                |
| <b>LC</b>             | Locus coeruleus                                                      |
| <b>LCRa</b>           | Líquido cefalorraquídeo artificial                                   |
| <b>MAO</b>            | Monoamino oxidasa                                                    |
| <b>MCL</b>            | Capa de células mitrales ( <i>Mitral cell layer</i> )                |
| <b>mmHg</b>           | Milímetros de mercurio                                               |
| <b>MOB</b>            | Bulbo olfatorio principal ( <i>main olfactory bulb</i> )             |
| <b>NA</b>             | Noradrenalina                                                        |
| <b>NET</b>            | Transportador de noradrenalina ( <i>norepinephrine transporter</i> ) |
| <b>NOS</b>            | Óxido nítrico sintasa                                                |
| <b>NPV</b>            | Núcleo paraventricular                                               |
| <b>NSO</b>            | Núcleo supraóptico                                                   |
| <b>Nt</b>             | Normotenso                                                           |
| <b>NTS</b>            | Núcleo del tracto solitario                                          |
| <b>ON</b>             | Óxido nítrico                                                        |
| <b>ONL</b>            | Capa del nervio olfativo ( <i>olfactory nerve layer</i> )            |
| <b>PA</b>             | Presión arterial                                                     |
| <b>PAD</b>            | Presión arterial diastólica                                          |

|                 |                                                   |
|-----------------|---------------------------------------------------|
| <b>PAM</b>      | Presión arterial media                            |
| <b>PAS</b>      | Presión arterial sistólica                        |
| <b>PC</b>       | Peso corporal                                     |
| <b>ROS</b>      | Especies reactivas del oxígeno                    |
| <b>RTP</b>      | Resistencia total periférica                      |
| <b>SFO</b>      | Órgano subfornical ( <i>subfornical organ</i> )   |
| <b>SHR</b>      | Ratas espontáneamente hipertensas                 |
| <b>SNC</b>      | Sistema nervioso central                          |
| <b>SRA</b>      | Sistema renina-angiotensina                       |
| <b>SRAA</b>     | Sistema renina-angiotensina-aldosterona           |
| <b>TH</b>       | Tirosina hidroxilasa                              |
| <b>THser19p</b> | Tirosina hidroxilasa fosforiladas en la serina 19 |
| <b>THser31p</b> | Tirosina hidroxilasa fosforiladas en la serina 31 |
| <b>THser40p</b> | Tirosina hidroxilasa fosforiladas en la serina 40 |
| <b>Tm</b>       | Temperatura de <i>melting</i>                     |
| <b>VI</b>       | Ventrículo izquierdo                              |
| <b>VM</b>       | Volumen minuto (gasto cardiaco)                   |
| <b>VP</b>       | Vasopresina (hormona antidiurética, ADH)          |
| <b>VS</b>       | Volumen sistólico                                 |
| <b>WB</b>       | Western blot                                      |

---

## Bibliografía

---

1. W.H.O. A global brief on Hypertension. Bulletin of the World Health Organization. - NLM Catalog - NCBI Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/7507052> (accessed on Jan 7, 2015).
2. World Health Statistics *Causes of death 2008 : data sources and methods*; 2011; Vol. 2010;.
3. Kannel, W. B. Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* **2000**, *85*, 251–5.
4. Consejo Argentino de Hipertensión Arterial Consenso de Hipertensión Arterial. *Rev. Argent. Cardiol.* **2013**, *81*, 1–80.
5. Fábregues, G.; Marín, M.; Majul, C.; Delucchi, A. Registro NAcional de Hipertensión Arterial Estudio RENATA-2 Registro Nacional de Hipertensión Arterial . Estudio RENATA-2. *Soc. Argentina Cardiol.* **2015**, 1–7.
6. Marin, M. J.; Fábregues, G.; Rodríguez, P. D.; Díaz, M.; Paez, O.; Alfie, J.; Caruso, G.; Pantalena, P. S.; Schiavi, B.; González, M. Registro nacional de hipertensión arterial. Conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial: estudio RENATA. *Rev. Argent. Cardiol.* **2012**, *80*, 121–129.
7. Page, I. H. The mosaic theory of arterial hypertension--its interpretation. *Perspect. Biol. Med.* **1967**, *10*, 325–33.
8. Harrison, D. G. The Mosaic Theory revisited: Common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2013, *7*, 68–74.
9. Addo, J.; Smeeth, L.; Leon, D. A. Hypertension in sub-Saharan Africa: A systematic review. *Hypertension* **2007**, *50*, 1012–1018, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.093336.
10. Matchar, D. B.; McCrory, D. C.; Orlando, L. A.; Patel, M. R.; Patel, U. D.; Patwardhan, M. B.; Powers, B.; Samsa, G. P.; Gray, R. N. Systematic review:

- Comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating essential hypertension. *Ann. Intern. Med.* 2008, **148**, 16–29.
11. Meneely, G. R.; Battarbee, H. D. High sodium-low potassium environment and hypertension. *Am. J. Cardiol.* **1976**, *38*, 768–785, doi:10.1016/0002-9149(76)90356-8.
  12. Higaki, J.; Katsuya, T.; Morishita, R.; Ogiwara, T. Symposium on the etiology of hypertension--summarizing studies in 20th century. 1. Hypertension and genes. *Intern Med* **2001**, *40*, 144–147.
  13. Keaney, J. F. Atherosclerosis: From lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 2000, *21*, 99–166.
  14. Kasparov, S.; Teschemacher, a G. Altered central catecholaminergic transmission and cardiovascular disease. *Exp. Physiol.* **2008**, *93*, 725–40, doi:10.1113/expphysiol.2007.041814.
  15. Dhaun, N.; Goddard, J.; Kohan, D. E.; Pollock, D. M.; Schiffrin, E. L.; Webb, D. J. *Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on*; 2008; Vol. 52, pp. 452–459;.
  16. Grippo, A. J.; Johnson, A. K. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress* 2009, *12*, 1–21.
  17. Smulyan, H.; Safar, M. E. The diastolic blood pressure in systolic hypertension. *Ann. Intern. Med.* **2000**, *132*, 233–7.
  18. Szczepanska-Sadowska, E. Review article ROLE OF NEUROPEPTIDES IN CENTRAL CONTROL. *J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *59 Suppl 8*, 61–89.
  19. Proietto, J.; Baur, L. A. 10: Management of obesity. *Med. J. Aust.* **2004**, *180*, 474–480.
  20. Smith, A. D.; Brands, M. W.; Wang, M.-H.; Dorrance, A. M. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-

- aldosterone system. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **2006**, 231, 282–287.
21. World Health Organization Sodium intake for adults and children. *Guidel. Potassium Intake Adults Child*. **2012**, 1–46.
  22. Oparil, S. Low Sodium Intake — Cardiovascular Health Benefit or Risk? *N. Engl. J. Med.* **2014**, 371, 677–679, doi:10.1056/NEJMe1407695.
  23. Oparil, S. Hypertension in 2010: new challenges in blood pressure goals and assessment. *Nat. Rev. Cardiol.* 2011, 8, 73–75.
  24. Sacks, F.; Svetkey, L.; Vollmer, W. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *New Engl. J. of Med.* **2001**, 344, 344.
  25. Obarzanek, E.; Proschan, M. A.; Vollmer, W. M.; Moore, T. J.; Sacks, F. M.; Appel, L. J.; Svetkey, L. P.; Most-Windhauser, M. M.; Cutler, J. A. Individual blood pressure responses to changes in salt intake: Results from the DASH-sodium trial. *Hypertension* **2003**, 42, 459–467, doi:10.1161/01.HYP.0000091267.39066.72.
  26. Cook, N. R.; Cutler, J. A.; Obarzanek, E.; Buring, J. E.; Rexrode, K. M.; Kumanyika, S. K.; Appel, L. J.; Whelton, P. K. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ* **2007**, 334, 885–8, doi:10.1136/bmj.39147.604896.55.
  27. Cook, N. R.; Appel, L. J.; Whelton, P. K. Lower levels of sodium intake and reduced cardiovascular risk. *Circulation* **2014**, 129, 981–989, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006032.
  28. Katori, M.; Majima, M. A missing link between a high salt intake and blood pressure increase. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, 100, 370–90, doi:10.1254/jphs.CRJ06003X.
  29. He, F. J.; Marciniak, M.; Visagie, E.; Markandu, N. D.; Anand, V.; Dalton, R. N.; MacGregor, G. A. Effect of modest salt reduction on blood pressure, urinary

- albumin, and pulse wave velocity in white, black, and asian mild hypertensives. *Hypertension* **2009**, *54*, 482–488, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.133223.
30. Wyss, J. M.; Yang, R. H.; Jin, H. K.; Oparil, S. Hypothalamic microinjection of alpha 2-adrenoceptor agonists causes greater sympathoinhibition in spontaneously hypertensive rats on high NaCl diets. *J. Hypertens.* **1988**, *6*, 805–13.
  31. Jose, P. A.; Eisner, G. M.; Felder, R. A. Regulation of Blood Pressure by Dopamine Receptors. *Nephron Physiol.* **2003**, *95*, p19–p27, doi:10.1159/000073676.
  32. Watson, R. E.; Supowit, S. C.; Zhao, H.; Katki, K. A.; DiPette, D. J. Role of sensory nervous system vasoactive peptides in hypertension. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 1033–1045.
  33. Oparil, S. The role of the central nervous system in hypertension. In *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 2<sup>o</sup> Ed; 1995; pp. 713–740.
  34. Wyss, J. M.; Carlson, S. H. The role of the nervous system in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **2001**, *3*, 255–62.
  35. Katsuya, T.; Ishikawa, K.; Sugimoto, K.; Rakugi, H.; Ogiwara, T. Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism. *Hypertens. Res.* **2003**, *26*, 521–5, doi:10.1291/hypres.26.521.
  36. Dampney, R. A. L. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv. Physiol. Educ.* **2016**, *40*, 283–296, doi:10.1152/advan.00027.2016.
  37. Bie, P.; Evans, R. G. Normotension, hypertension and body fluid regulation: brain and kidney. *Acta Physiol.* **2017**, *219*, 288–304.
  38. Brands, M. W. Chronic blood pressure control. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 2481–2494, doi:10.1002/cphy.c100056.
  39. Salman, I. M. Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function. *Curr. Hypertens. Rep.* **2016**,

18, 18.

40. Nishida, Y.; Tandai-Hiruma, M.; Kemuriyama, T.; Hagiwara, K. Long-term blood pressure control: Is there a set-point in the brain? *J. Physiol. Sci.* 2012, **62**, 147–161.
41. Joyner, M. J.; Limberg, J. K. Blood Pressure: Return of the Sympathetics? *Curr. Hypertens. Rep.* 2016, **18**, 7.
42. Dampney, R. A. L.; Horiuchi, J.; Killinger, S.; Sheriff, M. J.; Tan, P. S. P.; McDowall, L. M. Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: Some critical questions. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 2005; Vol. 32, pp. 419–425.
43. Badoer, E. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: The Hypothalamus HYPOTHALAMIC PARAVENTRICULAR NUCLEUS AND CARDIOVASCULAR REGULATION. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2001**, **28**, 95–99, doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03413.x.
44. Coote, J. H. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. In *Experimental Physiology*; 2005; Vol. 90, pp. 169–173.
45. Dampney, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* **1994**, **74**, 323–364, doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
46. Guyenet, P. G.; Schreihofer, a. M.; Stornetta, R. L. Regulation of Sympathetic Tone and Arterial Pressure by the Rostral Ventrolateral Medulla after Depletion of C1 Cells in Rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, **940**, 259–269, doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03682.x.
47. Kawabe, T.; Chitravanshi, V. C.; Kawabe, K.; Sapru, H. N. Cardiovascular function of a glutamatergic projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the nucleus tractus solitarius in the rat. *Neuroscience* **2008**, **153**, 605–617, doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.076.

48. Li, P.; Tjen, A. L. S. C.; Longhurst, J. C. Excitatory projections from arcuate nucleus to ventrolateral periaqueductal gray in electroacupuncture inhibition of cardiovascular reflexes. *Am.J.Physiol Hear. Circ.Physiol* **2006**, *290*, H2535–H2542, doi:10.1152/ajpheart.00972.2005.
49. da Silva, R. K. P.; Saad, W. A.; Renzi, A.; Menani, J.; de Arruda Camargo, L. A. Effect of lateral hypothalamus lesions on the water and salt intake, and sodium and urine excretion induced by activation of the median preoptic nucleus in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1995**, *53*, 195–204, doi:10.1016/0165-1838(94)00176-K.
50. Tanida, M.; Shen, J.; Nijima, A.; Yamatodani, A.; Oishi, K.; Ishida, N.; Nagai, K. Effects of olfactory stimulations with scents of grapefruit and lavender oils on renal sympathetic nerve and blood pressure in Clock mutant mice. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **2008**, *139*, 1–8, doi:10.1016/j.autneu.2007.12.001.
51. DiMicco, J. A.; Samuels, B. C.; Zaretskaia, M. V.; Zaretsky, D. V. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: Part renaissance, part revolution. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *71*, 469–480, doi:10.1016/S0091-3057(01)00689-X.
52. Plant, T. M. Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: Key advances over the last two Decades. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 719–726.
53. Yemane, H.; Busauskas, M.; Burris, S. K.; Knuepfer, M. M. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. *Exp. Physiol.* **2010**, *95*, 51–5, doi:10.1113/expphysiol.2008.046334.
54. Palkovits, M.; Brownstein, M. *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*; 1988; Vol. 151; ISBN 0030-6002 (Print)r0030-6002 (Linking).
55. Palkovits, M.; Kobayashi, R. M.; Kizer, J. S.; Jacobowitz, D. M.; Kopin, I. J. Effects of stress on catecholamines and tyrosine hydroxylase activity of individual hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology* **1975**, *18*, 144–153.
56. McCann, S. M.; Gutkowska, J.; Antunes-Rodrigues, J. Neuroendocrine control of

- body fluid homeostasis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2003, 36, 165–181.
57. Saper, C. B.; Loewy, A. D.; Swanson, L. W. Commentary on: Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. (1976) Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Research* 117:305–312. *Brain Res.* 2016, 1645, 12–14.
  58. Saper, C. B. Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. *J. Comp. Neurol.* **1985**, 237, 21–46, doi:10.1002/cne.902370103.
  59. Miselis, R. R. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res.* **1981**, 230, 1–23, doi:10.1016/0006-8993(81)90388-7.
  60. Gordon, F. J.; Brody, M. J.; Johnson, A. K. Regional depletion of central nervous system catecholamines: effects on blood pressure and drinking behavior. *Brain Res.* **1985**, 345, 285–97.
  61. Saper, C. B.; Reis, D. J.; Joh, T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci. Lett.* **1983**, 42, 285–291, doi:10.1016/0304-3940(83)90276-8.
  62. Wyss, J. M.; Yang, R. H.; Oparil, S. Lesions of the anterior hypothalamic area increase arterial pressure in NaCl-sensitive spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1990**, 31, 21–29, doi:10.1016/0165-1838(90)90168-I.
  63. Folkow, B.; Johansson, B.; Öberg, B. A Hypothalamic Structure with a Marked Inhibitory Effect on Tonic Sympathetic Activity. *Acta Physiol. Scand.* **1960**, 47, 262–270, doi:10.1111/j.1748-1716.1960.tb00077.x.
  64. Hilton, S. M.; Spyer, K. M. Participation of the anterior hypothalamus in the baroreceptor reflex. *J. Physiol.* **1971**, 218, 271–293.
  65. Nathan, M. A.; Reis, D. J. Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in the rat. *Circ. Res.* **1975**, 37, 226–235, doi:10.1161/01.RES.37.2.226.

66. Gellman, M. D.; Schneiderman, N.; Wallach, J. H.; LeBlanc, W. Cardiovascular responses elicited by hypothalamic stimulation in rabbits reveal a mediolateral organization. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1981**, *4*, 301–317, doi:10.1016/0165-1838(81)90034-5.
67. Zhu, J. N.; Yung, W. H.; Kwok-Chong Chow, B.; Chan, Y. S.; Wang, J. J. The cerebellar-hypothalamic circuits: Potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. *Brain Res. Rev.* 2006, *52*, 93–106.
68. Peng, N.; Meng, Q. C.; King, K.; Oparil, S.; Wyss, J. M. Acute hypertension increases norepinephrine release in the anterior hypothalamic area. *Hypertension* **1995**, *25*, 828–33.
69. Stojilkovic, S. S.; Catt, K. J. Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells. *Front. Neuroendocrinol.* 1996, *17*, 327–369.
70. Risold, P. Y.; Canteras, N. S.; Swanson, L. W. Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **1994**, *348*, 1–40, doi:10.1002/cne.903480102.
71. Risold, P. Y.; Thompson, R. H.; Swanson, L. W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **1997**, *24*, 197–254.
72. Oparil, S. Hypertension in postmenopausal women: pathophysiology and management. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1995**, *4*, 438–42.
73. Peng, N.; Oparil, S.; Meng, Q. C.; Wyss, J. M. Atrial natriuretic peptide regulation of noradrenaline release in the anterior hypothalamic area of spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2060–5, doi:10.1172/JCI119011.
74. Peng, N.; Chambless, B. D.; Oparil, S.; Wyss, J. M.  $\alpha_2$ -adrenergic receptors mediate sympathoinhibitory responses to atrial natriuretic peptide in the mouse anterior hypothalamic nucleus. *Hypertension* **2003**, *41*, 571–575, doi:10.1161/01.HYP.0000056998.83031.22.

75. Oparil, S. The sympathetic nervous system in clinical and experimental hypertension. *Kidney Int.* 1986, 30, 437–452.
76. Höcht, C.; Opezzo, J. A. W.; Taira, C. A. Anterior hypothalamic  $\beta$ -adrenergic activity in the maintenance of hypertension in aortic coarctated rats. *Pharmacol. Res.* **2004**, 49, 17–21, doi:10.1016/j.phrs.2003.07.003.
77. Calaresu, F. R.; Ciriello, J. Altered concentration of catecholamines in the hypothalamus of the rat after renal denervation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1981**, 59, 1274–7.
78. Budzikowski, A. S.; Vahid-Ansari, F.; Leenen, F. H. Chronic activation of brain areas by high-sodium diet in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, H2046-52.
79. Paxinos, G Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*; 2007; ISBN CD-ROM ISBN-13: 978-0-12-373721-2.
80. Rat Brain anatomy pictures Available online:  
<https://instruct.uwo.ca/anatomy/530/ratpix.pdf> (accessed on Jan 9, 2018).
81. Smith, J. K.; Barron, K. W. Posterior hypothalamic influences on cardiovascular effects of aortic nerve stimulation. *Am. J. Physiol.* **1989**, 257, H1994-2000, doi:10.1152/ajpheart.1989.257.6.H1994.
82. Barron, K. W.; Heesch, C. M. Cardiovascular effects of posterior hypothalamic stimulation in baroreflex-denervated rats. *Am. J. Physiol.* **1990**, 259, H720-7, doi:10.1152/ajpheart.1990.259.3.H720.
83. Martin, J. R. Evidence of systemic neuropeptide Y release after carbachol administration into the posterior hypothalamic nucleus. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1996**, 28, 447–457, doi:10.1097/00005344-199609000-00015.
84. Martin, J. R. Mechanisms of the cardiovascular response to posterior hypothalamic nucleus administration of carbachol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1996**, 27, 891–900, doi:10.1097/00005344-199606000-00018.
85. Hoover, W. B.; Vertes, R. P. Projections of the medial orbital and ventral orbital

- cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* **2011**, 519, 3766–3801, doi:10.1002/cne.22733.
86. Abrahamson, E. E.; Moore, R. Y. The posterior hypothalamic area: Chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Res.* **2001**, 889, 1–22, doi:10.1016/S0006-8993(00)03015-8.
  87. Çavdar, S.; Tangül, S.; Aker, R.; Şehirli, Ü.; Onat, F. Cerebellar connections to the dorsomedial and posterior nuclei of the hypothalamus in the rat. *J. Anat.* **2001**, 198, 37–45, doi:10.1017/S0021878200007172.
  88. Vertes, R. P.; Crane, A. M. Descending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: Phaseolus vulgaris leucoagglutinin analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.* **1996**, 374, 607–631, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961028)374:4<607::AID-CNE9>3.0.CO;2-5.
  89. De Wardener, H. E. The Hypothalamus and Hypertension. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 1599–1658, doi:10.1152/physrev.2001.81.4.1599.
  90. Tsumori, T.; Yokota, S.; Qin, Y.; Oka, T.; Yasui, Y. A light and electron microscopic analysis of the convergent insular cortical and amygdaloid projections to the posterior lateral hypothalamus in the rat, with special reference to cardiovascular function. *Neurosci. Res.* **2006**, 56, 261–269, doi:10.1016/j.neures.2006.07.005.
  91. Buñag, R. D.; Eferakeya, A. E. Immediate hypotensive after-effects of posterior hypothalamic lesions in awake rats with spontaneous, renal, or doca hypertension. *Cardiovasc. Res.* 1976, 10, 663–671.
  92. Berecek, K. H.; Wyss, J. M.; Swords, B. H. Alterations in vasopressin mechanisms in captopril-treated spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **1991**, A13, 1019–1031, doi:10.3109/10641969109042108.
  93. Berecek, K. H.; Kirk, K. A.; Nagahama, S.; Oparil, S. Sympathetic function in spontaneously hypertensive rats after chronic administration of captopril. *Am. J. Physiol.* **1987**, 252, H796–806, doi:10.1152/ajpheart.1987.252.4.H796.

94. Simon, O. R.; Basuray, B. N.; West, W. L.; Copeland, R. Interaction between the baroreflex and anterior hypothalamic stimulation. Demonstration of a noradrenergic involvement. *Neuropharmacology* **1985**, *24*, 665–675, doi:10.1016/0028-3908(85)90110-8.
95. Wible, J. H.; DiMicco, J. A.; Luft, F. C. Hypothalamic GABA and sympathetic regulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1989**, *14*, 623–628, doi:10.1161/01.HYP.14.6.623.
96. Elmquist, J. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol. Behav.* **2001**, *74*, 703–708.
97. Carmichael, C. Y.; Wainford, R. D. Hypothalamic Signaling Mechanisms in Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 2015, *17*, 39.
98. Simmonds, S. S.; Lay, J.; Stocker, S. D. Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats. *Hypertension* **2014**, *64*, 583–589, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03250.
99. Eilam, R.; Malach, R.; Segal, M. Selective elimination of hypothalamic neurons by grafted hypertension-inducing neural tissue. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 4891–4902.
100. Cain, D. P. The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychol. Bull.* **1974**, *81*, 654–671, doi:10.1037/h0036954.
101. Heine, O.; Galaburda, A. M. Olfactory asymmetry in the rat brain. *Exp. Neurol.* **1986**, *91*, 392–398, doi:10.1016/0014-4886(86)90078-6.
102. Nagayama, S.; Homma, R.; Imamura, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits* **2014**, *8*, 98, doi:10.3389/fncir.2014.00098.
103. Elsaesser, R.; Paysan, J. The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neurosci.* 2007, *8*, S1.
104. Igarashi, K. M.; Ieki, N.; An, M.; Yamaguchi, Y.; Nagayama, S.; Kobayakawa, K.; Kobayakawa, R.; Tanifuji, M.; Sakano, H.; Chen, W. R.; Mori, K. Parallel Mitral

- and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 7970–7985, doi:10.1523/JNEUROSCI.0154-12.2012.
105. Kelly, J. P.; Wrynn, A. S.; Leonard, B. E. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacol. Ther.* 1997, *74*, 299–316.
  106. Pohorecky, L. A.; Larin, F.; Wurtman, R. J. Mechanism of changes in brain norepinephrine levels following olfactory bulb lesions. *Life Sci.* **1969**, *8*, 1309–17.
  107. Pohorecky, L. A.; Zigmond, M. J.; Heimer, L.; Wurtman, R. J. Olfactory bulb removal: effects on brain norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1969**, *62*, 1052–5.
  108. Nakamura, T.; Hayashida, Y. Autonomic cardiovascular responses to smoke exposure in conscious rats. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, R738-45.
  109. Song, C.; Leonard, B. E. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005, *29*, 627–647.
  110. Ockert, D. M.; Czachurski, J.; Dembowski, K.; Seller, H. Central action of alpha-adrenoceptor agents on the baroreceptor reflex. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1992**, *41*, 93–101.
  111. Edwards, D. A.; Nahai, F. R.; Wright, P. Pathways linking the olfactory bulbs with the medial preoptic anterior hypothalamus are important for intermale aggression in mice. *Physiol. Behav.* **1993**, *53*, 611–615, doi:10.1016/0031-9384(93)90162-9.
  112. Kawasaki, H.; Watanabe, S.; Ueki, S. Changes in blood pressure and heart rate following bilateral olfactory bulbectomy in rats. *Physiol. Behav.* **1980**, *24*, 51–6.
  113. Kuwaki, T.; Kurihara, H.; Cao, W. H.; Kurihara, Y.; Uekawa, M.; Yazaki, Y.; Kumada, M. Physiological Role of Brain Endothelin in the Central Autonomic Control: From Neuron To Knockout Mouse. *Prog. Neurobiol.* **1997**, *51*, 545–579, doi:10.1016/S0301-0082(96)00063-9.
  114. Skofitsch, G.; Jacobowitz, D. M. Atrial natriuretic peptide in the central nervous

- system of the rat. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1988**, *8*, 339–91.
115. Saavedra, J. M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 329–380, doi:10.1210/edrv-13-2-329.
  116. Pilowsky, P. M.; Goodchild, A. K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 Years on. *J. Hypertens.* 2002, *20*, 1675–1688.
  117. Neafsey, E. J.; Hurley-Gius, K. M.; Arvanitis, D. The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. *Brain Res.* **1986**, *377*, 261–270, doi:10.1016/0006-8993(86)90867-X.
  118. Matsutani, S.; Yamamoto, N. Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anat. Sci. Int.* 2008, *83*, 218–227.
  119. Linster, C.; Nai, Q.; Ennis, M. Nonlinear effects of noradrenergic modulation of olfactory bulb function in adult rodents. *J. Neurophysiol.* **2011**, *105*, 1432–43, doi:10.1152/jn.00960.2010.
  120. Nagai, K.; Niiijima, A.; Horii, Y.; Shen, J.; Tanida, M. Olfactory stimulatory with grapefruit and lavender oils change autonomic nerve activity and physiological function. *Auton. Neurosci.* **2014**, *185*, 29–35, doi:10.1016/j.autneu.2014.06.005.
  121. Lahmeyer, H. W.; Bellur, S. N. Cardiac regulation and depression. *J. Psychiatr. Res.* **1987**, *21*, 1–6, doi:10.1016/0022-3956(87)90004-5.
  122. Davis, J.; Fujimoto, R. Y.; Juarez, D. T.; Hodges, K. A.; Asam, J. K. Major depression associated with rates of cardiovascular disease state transitions. *Am. J. Manag. Care* 2008, *14*, 125–8.
  123. Koizumi, S.; Kataoka, Y.; Niwa, M.; Kumakura, K. Endothelin-3 stimulates the release of catecholamine from cortical and striatal slices of the rat. *Neurosci. Lett.* **1992**, *134*, 219–222, doi:10.1016/0304-3940(92)90521-8.
  124. Gulati, A.; Rebello, S.; Kumar, A. Role of sympathetic nervous system in cardiovascular effects of centrally administered endothelin-1 in rats. *Am J Physiol* **1997**, *273*, H1177-86.

125. Allen, W. F. Olfactory and Trigeminal Conditioned Reflexes in Dogs. *Am. J. Physiol. Content* **1937**, 118, 532–540, doi:10.1152/ajplegacy.1937.118.3.532.
126. Grippo, A. J.; Moffitt, J. A.; Johnson, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, 282, R1333–R1341, doi:10.1152/ajpregu.00614.2001.
127. Moffitt, J. A.; Grippo, A. J.; Holmes, P. V.; Johnson, A. K. Olfactory bulbectomy attenuates cardiovascular sympathoexcitatory reflexes in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, 283, H2575–H2583, doi:10.1152/ajpheart.00164.2002.
128. Kohzuki, M.; Chai, S. Y. Y.; Paxinos, G.; Karavas, A.; Casley, D. J. J.; Johnston, C. I. I.; Mendelsohn, F. A. O. A. Localization and characterization of endothelin receptor binding sites in the rat brain visualized by in vitro autoradiography. *Neuroscience* **1991**, 42, 245–260, doi:10.1016/0306-4522(91)90162-H.
129. Kurokawa, K.; Yamada, H.; Ochi, J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **1997**, 389, 348–360, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19971215)389:2<348::AID-CNE11>3.0.CO;2-H.
130. Barefoot, J. C.; Helms, M. J.; Mark, D. B.; Blumenthal, J. A.; Califf, R. M.; Haney, T. L.; O'Connor, C. M.; Siegler, I. C.; Williams, R. B. Depression and long-term mortality risk in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* **1996**, 78, 613–617, doi:10.1016/S0002-9149(96)00380-3.
131. Langub, M. C.; Watson, R. E.; Herman, J. P. Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **1995**, 356, 183–199, doi:10.1002/cne.903560205.
132. Grippo, A. J.; Trahanas, D. M.; Zimmerman, R. R.; Porges, S. W.; Carter, C. S. Oxytocin protects against negative behavioral and autonomic consequences of long-term social isolation. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, 34, 1542–1553, doi:10.1016/j.psyneuen.2009.05.017.
133. Takahashi, N.; Smithies, O. Human genetics, animal models and computer

- simulations for studying hypertension. *Trends Genet.* 2004, 20, 136–145.
134. Lerman, L. O.; Chade, A. R.; Sica, V.; Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. *J. Lab. Clin. Med.* **2005**, 146, 160–73, doi:10.1016/j.lab.2005.05.005.
  135. Leong, X. F.; Ng, C. Y.; Jaarin, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res. Int.* 2015, 2015.
  136. Dornas, W. C.; Silva, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* 2011, 36, 731–737.
  137. OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn. Circ. J.* **1963**, 27, 282–293, doi:10.1253/jcj.27.282.
  138. Ooshima, A.; Yamori, Y.; Okamoto, K. Cardiovascular lesions in the selectively-bred group of spontaneously hypertensive rats with severe hypertension. *Jpn. Circ. J.* **1972**, 36, 797–812.
  139. Doggrell, S. A.; Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 1998, 39, 89–105.
  140. Morita, S.; Kitamura, K.; Yamamoto, Y.; Eto, T.; Osada, Y.; Sumiyoshi, A.; Kono, M.; Tanaka, K. Immunoreactive endothelin in human kidney. *Ann. Clin. Biochem.* **1991**, 28, 267–271, doi:10.1177/000456329102800312.
  141. Morita, M.; Kawashima, S.; Ikeoka, K.; Iwasaki, T. Effects of chronic hypertension and left ventricular hypertrophy on the extent of infarct expansion in rats. *Am J Hypertens* **1996**, 9, 753–759, doi:10.1016/0895-7061(96)00059-3.
  142. Conrad, C. H.; Brooks, W. W.; Robinson, K. G.; Bing, O. H. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am. J. Physiol.* **1991**, 260, H136–45, doi:10.1152/ajpheart.1991.260.1.H136.
  143. Kotchen, T. A.; Blehschmidt, N. G.; Reddy, S. R. Effect of dietary NaCl on norepinephrine turnover in the Dahl rat. *J Lab Clin Med* **1991**, 117, 383–389.
  144. Iwai, J.; Friedman, R.; Tassinari, L. Genetic influence on brain catecholamines: high brain noradrenaline in salt-sensitive rats. *Clin. Sci. (Lond).* **1980**, 59 Suppl 6,

263s–265s.

145. Orlov, S. N.; Mongin, A. A. Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H2039-53, doi:10.1152/ajpheart.00325.2007.
146. Huang, B. S.; Veerasingham, S. J.; Leenen, F. H. Brain “ouabain,” ANG II, and sympathoexcitation by chronic central sodium loading in rats. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, H1269-76.
147. Huang, B. S. Activation of brain renin-angiotensin-aldosterone system by central sodium in Wistar rats. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H1109–H1117, doi:10.1152/ajpheart.00024.2006.
148. Pinto, Y. M.; Paul, M.; Ganten, D. Lessons from rat models of hypertension: From Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 1998, *39*, 77–88.
149. Basting, T.; Lazartigues, E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr. Hypertens. Rep.* 2017, *19*, 32.
150. Yilmaz, M. S.; Millington, W. R.; Feleder, C. The preoptic anterior hypothalamic area mediates initiation of the hypotensive response induced by LPS in male rats. *Shock* **2008**, *29*, 232–237, doi:10.1097/shk.0b013e3180caac7e.
151. FOLLEY, S. J.; GREENBAUM, A. L. Adrenalectomy and replacement therapy in lactating rats; effect of deoxycorticosterone acetate on the water content of mammary tissue after adrenalectomy. *J. Endocrinol.* **1948**, *5*, 236–42.
152. Fujita, K.; Matsumura, Y.; Kita, S.; Miyazaki, Y.; Hisaki, K.; Takaoka, M.; Morimoto, S. Role of endothelin-1 and the ETAreceptor in the maintenance of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 925–930, doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb13292.x.
153. Larivière, R.; Deng, L. Y.; Day, R.; Sventek, P.; Thibault, G.; Schiffrin, E. L. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1995**, *27*, 2123–2131, doi:10.1016/S0022-2828(95)91263-0.

154. Matsumura, Y.; Hashimoto, N.; Taira, S.; Kuro, T.; Kitano, R.; Ohkita, M.; Oppenorth, T. J.; Takaoka, M. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension* **1999**, *33*, 759–65, doi:10.1161/01.hyp.35.1.464.
155. Allan, A.; Fenning, A.; Levick, S.; Hoey, A.; Brown, L. Reversal of cardiac dysfunction by selective ET-A receptor antagonism. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 846–853, doi:10.1038/sj.bjp.0706384.
156. Dorrance, A. M.; Rupp, N. C.; Nogueira, E. F. Mineralocorticoid receptor activation causes cerebral vessel remodeling and exacerbates the damage caused by cerebral ischemia. In *Hypertension*; 2006; Vol. 47, pp. 590–595.
157. O'Donoghue, T. L.; Brooks, V. L. Deoxycorticosterone acetate-salt rats: hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels. *Hypertension* **2006**, *47*, 680–685, doi:10.1161/01.HYP.0000214362.18612.6e.
158. O'Donoghue, T. L.; Qi, Y.; Brooks, V. L. Central action of increased osmolality to support blood pressure in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension* **2006**, *48*, 658–663, doi:10.1161/01.HYP.0000238140.06251.7a.
159. Viel, E. C.; Benkirane, K.; Javeshghani, D.; Touyz, R. M.; Schiffrin, E. L. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H281–H288, doi:10.1152/ajpheart.00304.2008.
160. Selye, H. Spironolactone actions, independent of mineralocorticoid blockade. *Steroids* **1969**, *13*, 803–808.
161. Abramoff, T.; Guil, M. J.; Morales, V. P.; Hope, S. I.; Soria, C.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Enhanced asymmetrical noradrenergic transmission in the olfactory bulb of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Neurochem. Res.* **2013**, *38*, 2063–71, doi:10.1007/s11064-013-1114-0.
162. Abramoff; Guil MJ; Morales VP; Hope SI; Höcht C; Bianciotti LG; and Vatta MS Involvement of endothelins in DOCA-salt hypertension through the modulation

- of noradrenergic transmission in the rat posterior hypothalamus. *Exp. Physiol.* **2015**, *100*, 617–627.
163. Kandlikar, S. S.; Fink, G. D. Mild DOCA-salt hypertension: sympathetic system and role of renal nerves. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *300*, H1781-7, doi:10.1152/ajpheart.00972.2010.
  164. Abrams, J. M.; Osborn, J. W. A role for benzamil-sensitive proteins of the central nervous system in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 2008; Vol. 35, pp. 687–694.
  165. Intengan, H.; Park, J.; Schiffrin, E. Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin. *Hypertension* **1999**, *34*, 907–913, doi:10.1161/01.HYP.34.4.907.
  166. Shi, X.; Habecker, B. A. Gp130 cytokines stimulate proteasomal degradation of tyrosine hydroxylase via extracellular signal regulated kinases 1 and 2. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 239–247, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07539.x.
  167. Schiffrin, E. L.; Larivière, R.; Li, J. S.; Sventek, P. Enhanced Expression of the Endothelin-1 Gene in Blood Vessels of DOCA-Salt Hypertensive Rats: Correlation with Vascular Structure. *J. Vasc. Res.* **1996**, *33*, 235–248, doi:10.1159/000159151.
  168. Schiffrin, E. L. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* **2005**, *43*, 19–29, doi:10.1016/j.vph.2005.03.004.
  169. Rubanyi, G. M.; Botelho, L. H. Endothelins. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2713–20.
  170. Allcock, G. H.; Venema, R. C.; Pollock, D. M. ETA receptor blockade attenuates the hypertension but not renal dysfunction in DOCA-salt rats. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, R245-52.
  171. Di Filippo, C.; D’Amico, M.; Piegari, E.; Rinaldi, B.; Filippelli, A.; Rossi, F. Local administration of ETA (but not ETB) blockers into the PAG area of the brain decreases blood pressure of DOCA-salt rats. *Naunyn. Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* **2002**, *366*, 123–126, doi:10.1007/s00210-002-0566-6.

172. Van den Berg, D. T.; de Kloet, E. R.; de Jong, W. Central effects of mineralocorticoid antagonist RU-28318 on blood pressure of DOCA-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* **1994**, *267*, E927-933, doi:10.1152/ajpendo.1994.267.6.E927.
173. Lariviere, R.; St-Louis, J.; Schiffrin, E. L. Vascular binding sites and biological activity of vasopressin in doca-salt hypertensive rats. *J.Hypertension.* **1988**, *6*, 211–217.
174. French, J. F.; Anderson, B. A.; Downs, T. R.; Dage, R. C. Dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase in rats with hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1995**, *26*, 107–13.
175. Wada, T.; Kanagawa, R.; Ishimura, Y.; Inada, Y.; Nishikawa, K. Role of angiotensin II in cerebrovascular and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* **1995**, *13*, 113–122.
176. Shelat, S. G.; King, J. L.; Flanagan-Cato, L. M.; Fluharty, S. J. Mineralocorticoids and glucocorticoids cooperatively increase salt intake and angiotensin II receptor binding in rat brain. *Neuroendocrinology* **1999**, *69*, 339–351, doi:10.1159/000054436.
177. Lucas, L. R.; Pompei, P.; McEwen, B. S. Salt appetite in salt-replete rats: involvement of mesolimbic structures in deoxycorticosterone-induced salt craving behavior. *Neuroendocrinology* **2000**, *71*, 386–395, doi:10.1159/000054559.
178. Omouessi, S. T.; Falconetti, C.; Fernet, B.; Thornton, S. N. DOCA stimulates salt appetite in Zucker rats: Effect of dose, synergistic action with central angiotensin II, and obesity. *Brain Res. Bull.* **2007**, *74*, 14–20, doi:10.1016/j.brainresbull.2007.04.001.
179. Pietranera, L.; Saravia, F. E.; McEwen, B. S.; Lucas, L. L.; Johnson, A. K.; De Nicola, A. F. Changes in fos expression in various brain regions during deoxycorticosterone acetate treatment: Relation to salt appetite, vasopressin mRNA and the mineralocorticoid receptor. *Neuroendocrinology* **2001**, *74*, 396–

406, doi:10.1159/000054706.

180. Thornton, S. N.; Omouessi, S. T.; Falconetti, C. Mineralocorticoid modulation of central angiotensin-induced neuronal activity, water intake and sodium appetite. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 699–705, doi:10.1590/S0100-879X2006005000092.
181. Xu, H.; Bian, X.; Watts, S. W.; Hlavacova, A. Activation of vascular BK channel by tempol in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* **2005**, *46*, 1154–1162, doi:10.1161/01.HYP.0000186278.50275.fa.
182. Noda, M.; Hiyama, T. Y. Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2015**, *467*, 465–474.
183. Abrams, J. M.; Engeland, W. C.; Osborn, J. W. Effect of intracerebroventricular benzamil on cardiovascular and central autonomic responses to DOCA-salt treatment. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *299*, R1500–R1510, doi:10.1152/ajpregu.00431.2010.
184. Katholi, R. E.; Naftilan, A. J. and Oparil, S.; Katholi, R. E.; Naftilan, A. J.; Oparil, S. Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension* **1979**, *2*, 266–73, doi:10.1161/01.HYP.2.3.266.
185. Phaner, M. J.; Galligan, J. J.; Swain, G. M. Increased catecholamine secretion from single adrenal chromaffin cells in DOCA-salt hypertension is associated with potassium channel dysfunction. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 1404–1413, doi:10.1021/cn400115v.
186. Buggy, J.; Fink, G. D.; Haywood, J. R.; Johnson, A. K.; Brody, M. J. Interruption of the maintenance phase of established hypertension by ablation of the anteroventral third ventricle (AV3v) in rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **1978**, *1*, 337–353, doi:10.3109/10641967809068612.
187. Bruner, C. A.; Mangiapane, M. L.; Fink, G. D.; Webb, R. C. Area postrema ablation and vascular reactivity in deoxycorticosterone-salt-treated rats. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **1988**, *11*, 668–73, doi:10.1161/01.HYP.11.6.668.

188. Takeda, K.; Buñag, R. D. Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats. *Hypertension* **1980**, *2*, 97–101.
189. Oparil, S.; Chen, Y. F.; Meng, Q. C.; Yang, R. H.; Jin, H.; Wyss, J. M. The neural basis of salt sensitivity in the rat: Altered hypothalamic function. *Am. J. Med. Sci.* **1988**, *295*, 360–369, doi:10.1097/00000441-198804000-00024.
190. De Champlain, J.; Mueller, R. A.; Axelrod, J. Turnover and synthesis of norepinephrine in experimental hypertension in rats. *Circ. Res.* **1969**, *25*, 285–91, doi:10.1161/01.res.25.3.285.
191. O'Hagan, K. P.; Thomas, G. D.; Zambraski, E. J. Renal denervation decreases blood pressure in doca-treated miniature swine with established hypertension. *Am. J. Hypertens.* **1990**, *3*, 62–64, doi:10.1093/ajh/3.1.62.
192. Moreau, P.; Schiffrin, E. L. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2003**, *81*, 511–521, doi:10.1139/y03-015.
193. Le Bourdelles, B.; Horellou, P.; Le Caer, J. P.; Deneffe, P.; Latta, M.; Haavik, J.; Guibert, B.; Mayaux, J. F.; Mallet, J. Phosphorylation of human recombinant tyrosine hydroxylase isoforms 1 and 2: An additional phosphorylated residue in isoform 2, generated through alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 17124–17130.
194. Kaufman, S. Tyrosine Hydroxylase. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; 2006; Vol. 70, pp. 103–220 ISBN 9780470123164.
195. Tekin, I.; Roskoski, R.; Carkaci-Salli, N.; Vrana, K. E. *Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase.*; 2014; Vol. 121; ISBN 0070201412.
196. Flatmark, T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol. Scand.* **2000**, *168*, 1–17, doi:10.1046/j.1365-201x.2000.00596.x.
197. Flatmark, T.; Almas, B.; Ziegler, M. G. Catecholamine metabolism: an update on key biosynthetic enzymes and vesicular monoamine transporters. *Ann. N. Y.*

*Acad. Sci.* **2002**, 971, 69–75.

198. Kumer, S. C.; Vrana, K. E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.* **1996**, 67, 443–62.
199. Dunkley, P. R.; Bobrovskaya, L.; Graham, M. E.; von Nagy-Felsobuki, E. I.; Dickson, P. W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J. Neurochem.* **2004**, 91, 1025–43, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02797.x.
200. Bagley, J.; LaRocca, G.; Jimenez, D. A.; Urban, N. N. Adult neurogenesis and specific replacement of interneuron subtypes in the mouse main olfactory bulb. *BMC Neurosci.* **2007**, 8, doi:10.1186/1471-2202-8-92.
201. Groves, A. K.; George, K. M.; Tissier-Seta, J. P.; Engel, J. D.; Brunet, J. F.; Anderson, D. J. Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Development* **1995**, 121, 887–901, doi:VL - 121.
202. Ramsey, A. J.; Fitzpatrick, P. F. Effects of phosphorylation of serine 40 of tyrosine hydroxylase on binding of catecholamines: Evidence for a novel regulatory mechanism. *Biochemistry* **1998**, 37, 8980–8986, doi:10.1021/bi980582l.
203. Fitzpatrick, P. F. Tetrahydropterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 355–381, doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.355.
204. Haycock, J. W. Short- and long-term regulation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells by VIP and PACAP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, 805, 219–30–1.
205. Icard-Liepkalns, C.; Berrard, S.; Faucon Biguet, N.; Lebourdelles, B.; Ravassard, P.; Robert, J. J.; Mallet, J. Tyrosine hydroxylase regulation in neurotransmission and neuroplasticity. *J. Physiol. Paris* **1993**, 87, 153–7.
206. Takekoshi, K.; Ishii, K.; Shibuya, S.; Kawakami, Y.; Isobe, K.; Nakai, T. Stimulation of catecholamine biosynthesis via the protein kinase C pathway by endothelin-1 in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 63, 977–84.
207. Takekoshi, K.; Ishii, K.; Kawakami, Y.; Isobe, K.; Nanmoku, T.; Nakai, T. Ca(2+)

- mobilization, tyrosine hydroxylase activity, and signaling mechanisms in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells: effects of leptin. *Endocrinology* **2001**, *142*, 290–298, doi:10.1210/endo.142.1.7914.
208. Moy, L. Y.; Tsai, L. H. Cyclin-dependent Kinase 5 phosphorylates serine 31 of tyrosine hydroxylase and regulates its stability. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 54487–54493, doi:10.1074/jbc.M406636200.
  209. Daubner, S. C.; Le, T.; Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *508*, 1–12, doi:10.1016/j.abb.2010.12.017.
  210. Dickson, P. W.; Briggs, G. D. Tyrosine hydroxylase. Regulation by feedback inhibition and phosphorylation. *Adv. Pharmacol.* **2013**, *68*, 13–21, doi:10.1016/B978-0-12-411512-5.00002-6.
  211. Perfume, G.; Nabhen, S. L.; Barrera, K. R.; Otero, M. G.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Long-term modulation of tyrosine hydroxylase activity and expression by endothelin-1 and -3 in the rat anterior and posterior hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *294*, R905-14, doi:10.1152/ajpregu.00555.2007.
  212. Nabhen, S. L.; Morales, V. P.; Guil, M. J.; Höcht, C.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Mechanisms involved in the long-term modulation of tyrosine hydroxylase by endothelins in the olfactory bulb of normotensive rats. *Neurochem. Int.* **2011**, *58*, 196–205, doi:10.1016/j.neuint.2010.11.016.
  213. Haycock, J. W.; Lew, J. Y.; Garcia-Espana, A.; Lee, K. Y.; Harada, K.; Meller, E.; Goldstein, M. Role of serine-19 phosphorylation in regulating tyrosine hydroxylase studied with site- and phosphospecific antibodies and site-directed mutagenesis. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1670–5, doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71041670.x.
  214. Nakashima, A.; Hayashi, N.; Kaneko, Y. S.; Mori, K.; Sabban, E. L.; Nagatsu, T.; Ota, A. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. *J. Neural Transm.* 2009, *116*, 1355–1362.

215. Nakashima, A.; Kaneko, Y. S.; Kodani, Y.; Mori, K.; Nagasaki, H.; Nagatsu, T.; Ota, A. Intracellular stability of tyrosine hydroxylase. Phosphorylation and proteasomal digestion of the enzyme. *Adv. Pharmacol.* **2013**, *68*, 3–11, doi:10.1016/B978-0-12-411512-5.00001-4.
216. Nakashima, A.; Mori, K.; Kaneko, Y. S.; Hayashi, N.; Nagatsu, T.; Ota, A. Phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase triggers proteasomal digestion of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 343–347, doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.020.
217. Salvatore, M. F.; Garcia-Espana, A.; Goldstein, M.; Deutch, A. Y.; Haycock, J. W. Stoichiometry of tyrosine hydroxylase phosphorylation in the nigrostriatal and mesolimbic systems in vivo: Effects of acute haloperidol and related compounds. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 225–232, doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750225.x.
218. Bauman, A. L.; Apparsundaram, S.; Ramamoorthy, S.; Wadzinski, B. E.; Vaughan, R. A.; Blakely, R. D. Cocaine and antidepressant-sensitive biogenic amine transporters exist in regulated complexes with protein phosphatase 2A. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 7571–8.
219. Haycock, J. W. Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31, and Ser40. *Neurochem. Res.* **1993**, *18*, 15–26, doi:10.1007/BF00966919.
220. Stachowiak, M. K.; Jiang, H. K.; Poisner, A. M.; Tuominen, R. K.; Hong, J. S. Short and long term regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by angiotensin in cultured adrenal medullary cells. Molecular mechanisms and nature of second messenger systems. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4694–4702.
221. Lewis, E. J.; Tank, A. W.; Weiner, N.; Chikaraishi, D. M. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14632–1437.
222. Kvetnansky, R.; Nankova, B.; Hiremagalur, B.; Viskupic, E.; Viator, I.; Rusnak, M.;

- McMahon, A.; Kopin, I. J.; Sabban, E. L. Induction of adrenal tyrosine hydroxylase mRNA by single immobilization stress occurs even after splanchnic transection and in the presence of cholinergic antagonists. *J Neurochem* **1996**, *66*, 138–146.
223. Sterling, C. R.; Tank, A. W. Adrenal tyrosine hydroxylase activity and gene expression are increased by intraventricular administration of nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 15–21.
224. Yoshimura, R.; Xu, L.; Sun, B.; Tank, A. W. Nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors are essential for the long-term response of tyrosine hydroxylase gene expression to chronic nicotine treatment in rat adrenal medulla. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2004**, *126*, 188–97, doi:10.1016/j.molbrainres.2004.04.007.
225. Xu, L.; Chen, X.; Sun, B.; Sterling, C.; Tank, A. W. Evidence for regulation of tyrosine hydroxylase mRNA translation by stress in rat adrenal medulla. *Brain Res.* **2007**, *1158*, 1–10, doi:10.1016/j.brainres.2007.04.080.
226. Lazaroff, M.; Patankar, S.; Sung Ok Yoon; Chikaraishi, D. M. The cyclic AMP response element directs tyrosine hydroxylase expression in catecholaminergic central and peripheral nervous system cell lines from transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21579–21589, doi:10.1074/jbc.270.37.21579.
227. Lenartowski, R.; Goc, A. Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2011, *29*, 873–883.
228. Nankova, B.; Hiremagalur, B.; Menezes, A.; Zeman, R.; Sabban, E. Promoter elements and second messenger pathways involved in transcriptional activation of tyrosine hydroxylase by ionomycin. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1996**, *35*, 164–72.
229. DeCastro, M.; Nankova, B. B.; Shah, P.; Patel, P.; Mally, P. V; Mishra, R.; La Gamma, E. F. Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Mol. Brain Res.* **2005**, *142*, 28–38, doi:10.1016/j.molbrainres.2005.09.002.

230. Lewis-Tuffin, L. J.; Quinn, P. G.; Chikaraishi, D. M. Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *25*, 536–547, doi:10.1016/j.mcn.2003.10.010.
231. Rusnak, M.; Gainer, H. Differential effects of forskolin on tyrosine hydroxylase gene transcription in identified brainstem catecholaminergic neuronal subtypes in organotypic culture. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 889–898, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03913.x.
232. Sun, B.; William Tank, A. c-Fos is essential for the response of the tyrosine hydroxylase gene to depolarization or phorbol ester. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 1421–1430, doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01789.x.
233. Egan, B. M.; Petrin, J.; Hoffmann, R. G. NaCl induces differential changes of regional vascular reactivity in salt-sensitive versus salt-resistant men. *Am. J. Hypertens.* **1991**, *4*, 924–931, doi:10.1093/ajh/4.12.924.
234. DeQuattro, V.; Feng, M. The sympathetic nervous system: The muse of primary hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **2002**, *16*, S64–S69, doi:10.1038/sj.jhh.1001346.
235. Dequattro, V.; Chan, S. Raised Plasma-Catecholamines in Some Patients With Primary Hypertension. *Lancet* **1972**, *299*, 806–809, doi:10.1016/S0140-6736(72)90796-9.
236. Eide, I.; Kolloch, R.; De Quattro, V.; Miano, L.; Dugger, R.; Van der Meulen, J. Raised cerebrospinal fluid norepinephrine in some patients with primary hypertension. *Hypertension* **1979**, *1*, 255–260.
237. Esler, M.; Jackman, G.; Bobik, A.; Leonard, P.; Kelleher, D.; Skews, H.; Jennings, G.; Korner, P. Norepinephrine kinetics in essential hypertension. Defective neuronal uptake of norepinephrine in some patients. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **2003**, *3*, 149–56, doi:10.1161/01.hyp.0000050928.96979.a5.
238. Duale, H.; Waki, H.; Howorth, P.; Kasparov, S.; Teschemacher, A. G.; Paton, J. F. R. Restraining influence of A2 neurons in chronic control of arterial pressure in

- spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *76*, 184–193, doi:10.1016/j.cardiores.2007.06.018.
239. Silva de Oliveira, L. C.; Bonagamba, L. G. H.; Machado, B. H. Noradrenergic inhibitory modulation in the caudal commissural NTS of the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **2007**, *136*, 63–68, doi:10.1016/j.autneu.2007.04.004.
  240. Pons, F.; Lupón, J.; Urrutia, A.; González, B.; Crespo, E.; Díez, C.; Cano, L.; Cabanes, R.; Altimir, S.; Coll, R.; Pascual, T.; Valle, V.; Lupón Rosés, J. Mortality and Cause of Death in Patients With Heart Failure: Findings at a Specialist Multidisciplinary Heart Failure Unit. *Rev Esp Cardiol* **2010**, *63*, 303–14, doi:10.1016/S1885-5857(10)70063-3.
  241. Mallet, J. The TiPS/TINS Lecture. Catecholamines: from gene regulation to neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 191–6, doi:10.1016/S0166-2236(96)10029-1.
  242. Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **1988**, *332*, 411–415, doi:10.1038/332411a0.
  243. Yanagisawa, M.; Inoue, A.; Ishikawa, T.; Kasuya, Y.; Kimura, S.; Kumagaye, S.; Nakajima, K.; Watanabe, T. X.; Sakakibara, S.; Goto, K. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 6964–6967, doi:10.1073/pnas.85.18.6964.
  244. Kohan, D. E.; Rossi, N. F.; Inscho, E. W.; Pollock, D. M. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 1–77, doi:10.1152/physrev.00060.2009.
  245. Davenport, A. P.; Hyndman, K. A.; Dhaun, N.; Southan, C.; Kohan, D. E.; Pollock, J. S.; Pollock, D. M.; Webb, D. J.; Maguire, J. J. Endothelin. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 357–418, doi:10.1124/pr.115.011833.

246. Kaoukis, A.; Deftereos, S.; Raisakis, K.; Giannopoulos, G.; Bouras, G.; Panagopoulou, V.; Papoutsidakis, N.; Cleman, M. W.; Stefanadis, C. The role of endothelin system in cardiovascular disease and the potential therapeutic perspectives of its inhibition. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 95–114, doi:10.2174/1568026611313020003.
247. Schneider, M. P.; Boesen, E. I.; Pollock, D. M. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 731–59, doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105134.
248. Levin, E. R. Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 356–363, doi:10.1056/NEJM199508103330607.
249. King, R. G.; Gude, N. M.; Di Iulio, J. L.; Brennecke, S. P. Regulation of human placental fetal vessel tone: Role of nitric oxide. *Reprod. Fertil. Dev.* **1995**, *7*, 1407–1411, doi:10.1071/RD9951407.
250. Khimji, A. karim; Rockey, D. C. Endothelin-Biology and disease. *Cell. Signal.* 2010, *22*, 1615–1625.
251. Barton, M.; Yanagisawa, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy This article is one of a selection of papers published in the special issue (part 2 of 2) on Forefronts in Endothelin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *86*, 485–498, doi:10.1139/Y08-059.
252. Davenport, A. P. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 219–226, doi:10.1124/pr.54.2.219.
253. Opgenorth, T. J. Endothelin receptor antagonism. *Adv. Pharmacol.* **1995**, *33*, 1–65, doi:10.1016/S1054-3589(08)60665-1.
254. Maguire, J. J.; Davenport, a P. Endothelin@25 - new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR Review 12. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 5555–72, doi:10.1111/bph.12874.
255. Wang, H.-H. H.; Hsieh, H.-L. L.; Yang, C.-M. M. Nitric oxide production by

- endothelin-1 enhances astrocytic migration via the tyrosine nitration of matrix metalloproteinase-9. *J. Cell. Physiol.* **2011**, 226, 2244–56, doi:10.1002/jcp.22560.
256. Kedzierski, R. M.; Yanagisawa, M. E. *ENDOTHELIN* S *YSTEM* : The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 851–876, doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.851.
  257. D'Orléans-Juste, P.; Labonté, J.; Bkaily, G.; Choufani, S.; Plante, M.; Honoré, J. C. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 95, 221–38, doi:S0163725802002358 [pii].
  258. Karne, S.; Jayawickreme, C. K.; Lerner, M. R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET(c) receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 19126–19133.
  259. Perfume, G.; Morgazo, C.; Nabhen, S.; Battistone, A.; Hope, S. I.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Short-term regulation of tyrosine hydroxylase activity and expression by endothelin-1 and endothelin-3 in the rat posterior hypothalamus. *Regul. Pept.* **2007**, 142, 69–77, doi:10.1016/j.regpep.2007.01.011.
  260. Nabhen, S. L.; Perfume, G.; Battistone, M. a; Rossi, A.; Abramoff, T.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Short-term effects of endothelins on tyrosine hydroxylase activity and expression in the olfactory bulb of normotensive rats. *Neurochem. Res.* **2009**, 34, 953–63, doi:10.1007/s11064-008-9859-6.
  261. Hope, S. I.; Nabhen, S. L.; Soria, C.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Endothelin-1 and -3 modulate the neuronal norepinephrine transporter through multiple signalling pathways in the rat posterior hypothalamus. *Neurochem. Int.* **2010**, 57, 306–13, doi:10.1016/j.neuint.2010.06.009.
  262. Thorin, E.; Clozel, M. The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1. *Adv. Pharmacol.* **2010**, 60, 1–26, doi:10.1016/B978-0-12-385061-4.00001-5.

263. Watts, S. W. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *298*, R254-60, doi:10.1152/ajpregu.00584.2009.
264. Henry, P. J.; King, S. H. Typical endothelin ETA receptors mediate atypical endothelin-1-induced contractions in sheep isolated tracheal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1385–1390.
265. Nambi, P.; Pullen, M.; Kincaid, J.; Nuthulaganti, P.; Aiyar, N.; Brooks, D. P.; Gellai, M.; Kumar, C. Identification and characterization of a novel endothelin receptor that binds both ETA- and ETB-selective ligands. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 582–9, doi:10.1124/mol.52.4.582.
266. Di Nunzio, A. S.; Legaz, G.; Rodano, V.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Modulatory effect of endothelin-1 and -3 on neuronal norepinephrine release in the rat posterior hypothalamus. *Regul. Pept.* **2004**, *118*, 51–9, doi:10.1016/j.regpep.2003.10.034.
267. Gregan, B.; Schaefer, M.; Rosenthal, W.; Oksche, A. Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. In *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 2004; Vol. 44, pp. S30-3.
268. Harada, N.; Himeno, A.; Shigematsu, K.; Sumikawa, K.; Niwa, M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: Possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2002**, *22*, 207–226, doi:10.1023/A:1019822107048.
269. Hatae, N.; Aksentijevich, N.; Zemkova, H. W.; Kretschmannova, K.; Tomić, M.; Stojilkovic, S. S. Cloning and Functional Identification of Novel Endothelin Receptor Type A Isoforms in Pituitary. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 1192–1204, doi:10.1210/me.2006-0343.
270. Brunner, F. Role of endothelin, nitric oxide and L-arginine release in ischaemia/reperfusion injury of rat heart. *Cardiovasc. ...* **1997**, *36*, 60–66, doi:10.1006/jmcc.1997.0470.

271. Brunner, F.; Brás-Silva, C.; Cerdeira, A. S.; Leite-Moreira, A. F. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 2006, **111**, 508–531.
272. Best, P. J.; McKenna, C. J.; Hasdai, D.; Holmes, D. R. J.; Lerman, A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* **1999**, *99*, 1747–1752, doi:10.1161/01.cir.99.13.1747.
273. Bauersachs, J.; Fraccarollo, D.; Galuppo, P.; Widder, J.; Ertl, G. Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *47*, 142–149, doi:10.1016/S0008-6363(00)00083-3.
274. Andreis, P. G.; Tortorella, C.; Malendowicz, L. K.; Nussdorfer, G. G. Endothelins stimulate aldosterone secretion from dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells, acting through ETB receptors coupled with the phospholipase C-dependent signaling pathway. *Peptides* **2001**, *22*, 117–122, doi:10.1016/S0196-9781(00)00363-6.
275. Amiri, F.; Viridis, A.; Fritsch Neves, M.; Iglarz, M.; Seidah, N. G.; Touyz, R. M.; Reudelhuber, T. L.; Schiffrin, E. L. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* **2004**, *110*, 2233–2240, doi:10.1161/01.CIR.0000144462.08345.B9.
276. Donckier, J. E.; Michel, L.; Delos, M.; Havaux, X. Expression of endothelin-1 by adrenocortical carcinoma: A new target for anti-cancer therapy? *Acta Chir. Belg.* **2004**, *104*, 581–3.
277. Ariza, A. C.; Bobadilla, N. A.; Halhali, A. [Endothelin 1 and angiotensin II in preeclampsia]. *Rev Invest Clin* **2007**, *59*, 48–56.
278. Motte, S.; McEntee, K.; Naeije, R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 386–414, doi:10.1016/j.pharmthera.2005.08.012.
279. Maguire, J.; Davenport, A. P. Alternative pathway to endothelin-converting enzyme for the synthesis of endothelin in human blood vessels. In *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 2004; Vol. 44, pp. S27-9.

280. Naicker, S.; Bhoola, K. D. Endothelins: Vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 2001, **90**, 61–88.
281. Rubanyi, G. M.; Polokoff, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **1994**, **46**, 325–415.
282. Jaureguiberry, M. S.; di Nunzio, A. S.; Dattilo, M. a; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Endothelin 1 and 3 enhance neuronal nitric oxide synthase activity through ETB receptors involving multiple signaling pathways in the rat anterior hypothalamus. *Peptides* **2004**, **25**, 1133–8, doi:10.1016/j.peptides.2004.04.005.
283. Sokolovsky, M. Endothelin receptors in rat cerebellum: Activation of phosphoinositide hydrolysis is transduced by multiple G-proteins. *Cell. Signal.* **1993**, **5**, 473–483, doi:10.1016/0898-6568(93)90087-3.
284. Sokolovsky, M.; Shraga-Levine, Z.; Galron, R. Ligand-Specific Stimulation/Inhibition of cAMP Formation by a Novel Endothelin Receptor Subtype. *Biochemistry* **1994**, **33**, 11417–11419, doi:10.1021/bi00204a002.
285. Sokolovsky, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **1995**, **68**, 435–71, doi:10.1016/0163-7258(95)02015-2.
286. Di Nunzio, A. S.; Jaureguiberry, M. S.; Rodano, V.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Endothelin-1 and -3 diminish neuronal NE release through an NO mechanism in rat anterior hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, **283**, R615–22, doi:10.1152/ajpregu.00026.2002.
287. Morgazo, C.; Perfume, G.; Legaz, G.; di Nunzio, A.; Hope, S. I.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Involvement of nitric oxide pathways in short term modulation of tyrosine hydroxylase activity by endothelins 1 and 3 in the rat anterior hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, **334**, 796–802, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.168.
288. Resink, T. J.; Scott-Burden, T.; Buhler, F. R. Activation of phospholipase A2 by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res.*

*Commun.* **1989**, *158*, 279–286.

289. Resink, T. J.; Hahn, A. W.; Scott-Burden, T.; Powell, J.; Weber, E.; Bühler, F. R. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 1303–1310, doi:10.1016/0006-291X(90)91171-N.
290. Fu, T.; Chang, W.; Ishida, N.; Saida, K.; Mitsui, Y.; Okano, Y.; Nozawa, Y. Effects of vasoactive intestinal contractor (VIC) and endothelin on intracellular calcium level in neuroblastoma NG108-15 cells. *FEBS Lett.* **1989**, *257*, 351–3.
291. Lin, W. W.; Lee, C. Y.; Chuang, D. M. Comparative studies of phosphoinositide hydrolysis induced by endothelin-related peptides in cultured cerebellar astrocytes, C6-glioma and cerebellar granule cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 512–9.
292. Marsault, R.; Vigne, P.; Breittmayer, J. P.; Frelin, C. Astrocytes Are Target Cells for Endothelins and Sarafotoxin. *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 2142–2144, doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb04921.x.
293. Yue, T. L.; Gleason, M. M.; Hallenbeck, J.; Feuerstein, G. Characterization of platelet-activating factor-induced elevation of cytosolic free-calcium level in neurohybrid NCB-20 cells. *Neuroscience* **1991**, *41*, 177–185, doi:10.1016/0306-4522(91)90208-6.
294. Lysko, P. G.; Feuerstein, G.; Pullen, M.; Wu, H.-L.; Nambi, P. Identification of endothelin receptors in cultured cerebellar neurons. *Neuropeptides* **1991**, *18*, 83–86, doi:10.1016/0143-4179(91)90005-4.
295. Krsmanovic, L. Z.; Stojilkovic, S. S.; Balla, T.; al Damluji, S.; Weiner, R. I.; Catt, K. J. Receptors and neurosecretory actions of endothelin in hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11124–11128, doi:10.1073/pnas.88.24.11124.
296. Ambar, I.; Sokolovsky, M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur J Pharmacol* **1993**, *245*, 31–41.

297. Sluck, J. M.; Lin, R. C. S.; Katolik, L. I.; Jeng, A. Y.; Lehmann, J. C. Endothelin converting enzyme-1-, endothelin-1-, and endothelin-3-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience* **1999**, *91*, 1483–1497, doi:10.1016/S0306-4522(98)00692-7.
298. Neylon, C. B. Vascular biology of endothelin signal transduction. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 1999; Vol. 26, pp. 149–153.
299. Kawanabe, Y.; Nozaki, K.; Hashimoto, N.; Masaki, T. Involvement of extracellular Ca<sup>2+</sup> influx and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase transactivation in endothelin-1-induced arachidonic acid release. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 1516–22, doi:10.1038/sj.bjp.0705386.
300. Reynolds, E. E.; Mok, L. L. Role of thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *252*, 915–921.
301. Komuro, I.; Kurihara, H.; Sugiyama, T.; Yoshizumi, M.; Takaku, F.; Yazaki, Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **1988**, *238*, 249–52.
302. Zamora, M. A.; Dempsey, E. C.; Walchak, S. J.; Stelzner, T. J. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1993**, *9*, 429–433, doi:10.1165/ajrcmb/9.4.429.
303. Clerk, A.; Kemp, T. J.; Harrison, J. G.; Mullen, A. J.; Barton, P. J. R.; Sugden, P. H. Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 101–10, doi:10.1042/BJ20021083.
304. Vatta, M. S. Natriuretic peptides and endothelins: More than vasoactive peptides insights into their role in the regulation of gastrointestinal function. In *Function of neuropeptides at central nervous system*; 2009; pp. 171–201.
305. Vatta, M. *Heart Rhythm*. February 2009, pp. 219–220.

306. Vatta, M. S.; Bianciotti, L. G.; Guil, M. J.; Hope, S. I. Regulation of the Norepinephrine Transporter by Endothelins: A potential therapeutic target. *Vitam. Horm.* **2015**, *98*, 371–405, doi:10.1016/bs.vh.2014.12.013.
307. Wright, J. W.; Harding, J. W. Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin- angiotensin system. *Brain Res. Rev.* 1997, *25*, 96–124.
308. Hope, S. I.; Schmipp, J.; Rossi, A. H.; Bianciotti, L. G.; Vatta, M. S. Regulation of the neuronal norepinephrine transporter by endothelin-1 and -3 in the rat anterior and posterior hypothalamus. *Neurochem. Int.* **2008**, *53*, 207–13, doi:10.1016/j.neuint.2008.07.003.
309. de Nucci, G.; Thomas, R.; D’Orleans-Juste, P.; Antunes, E.; Walder, C.; Warner, T. D.; Vane, J. R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 9797–9800, doi:10.1073/pnas.85.24.9797.
310. Kawano, Y.; Yoshida, K.; Yoshimi, H.; Kuramochi, M.; Omae, T. The cardiovascular effect of intracerebroventricular endothelin in rats. *J. Hypertens. Suppl.* **1989**, *7*, S22-3.
311. Yamamoto, T.; Kimura, T.; Ota, K.; Shoji, M.; Inoue, M.; Sato, K.; Ohta, M.; Yoshinaga, K. Central effects of endothelin-1 on vasopressin and atrial natriuretic peptide release and cardiovascular and renal function in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **1991**, *17 Suppl 7*, S316-8.
312. Kawasaki, S.; Takeda, K.; Tanaka, M.; Itoh, H.; Hirata, M.; Nakata, T.; Hayashi, J.; Oguro, M.; Sasaki, S.; Nakagawa, M. Enhanced norepinephrine release in hypothalamus from locus coeruleus in SHR. *Jpn Hear. J* **1991**, *32*, 255–262, doi:10.1536/ihj.32.255.
313. Boarder, M. R.; Marriott, D. B. Endothelin-1 stimulation of noradrenaline and adrenaline release from adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 521–526, doi:10.1016/0006-2952(91)90623-D.
314. Belloni, A. S.; Andreis, P. G.; Macchi, V.; Gottardo, G.; Malendowicz, L. K.;

- Nussdorfer, G. G. Distribution and functional significance of angiotensin-II AT1- and AT2-receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Endocr. Res.* **1998**, *24*, 1–15, doi:10.3109/07435809809031865.
315. Yamamoto, S.; Inenaga, K.; Kannan, H.; Eto, S.; Yamashita, H. The Actions of Endothelin on Single Cells in the Anteroventral Third Ventricular Region and Supraoptic Nucleus in Rat Hypothalamic Slices. *J. Neuroendocrinol.* **1993**, *5*, 427–434, doi:10.1111/j.1365-2826.1993.tb00504.x.
  316. Misu, Y.; Goshima, Y.; Ueda, H.; Okamura, H. Neurobiology of L-DOPAergic systems. *Prog. Neurobiol.* 1996, *49*, 415–454.
  317. Haynes, W. G.; Webb, D. J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J. Hypertens.* **1998**, *16*, 1081–1098, doi:10.1097/00004872-199816080-00001.
  318. Kuwaki, T.; Ling, G. Y.; Onodera, M.; Ishii, T.; Nakamura, A.; Ju, K. H.; Cao, W. H.; Kumada, M.; Kurihara, H.; Kurihara, Y.; Yazaki, Y.; Ohuchi, T.; Yanagisawa, M.; Fukuda, Y. Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1999**, *26*, 989–994, doi:10.1046/j.1440-1681.1999.03177.x.
  319. Samson, W. K.; Skala, K.; Steven Huang, F. L.; Gluntz, S.; Alexander, B.; Gómez-Sánchez, C. E. Central nervous system action of endothelin-3 to inhibit water drinking in the rat. *Brain Res.* **1991**, *539*, 347–351, doi:10.1016/0006-8993(91)91643-F.
  320. Goodwin, A. T.; Amrani, M.; Gray, C. C.; Jayakumar, J.; Yacoub, M. H. Role of endogenous endothelin in the regulation of basal coronary tone in the rat. *J. Physiol.* **1998**, *511*, 549–557, doi:10.1111/j.1469-7793.1998.549bh.x.
  321. Yu, M.; Gopalakrishnan, V.; Wilson, T. W.; McNeill, J. R. Endothelin antagonist reduces hemodynamic responses to vasopressin in DOCA-salt hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**, *281*, H2511-7.
  322. Neveu, P. J.; Liège, S.; Sarrieau, A. Asymmetrical distribution of hippocampal mineralocorticoid receptors depends on lateralization in mice.

*Neuroimmunomodulation* 5, 16–21.

- 323. Xavier, C. H.; Nalivaiko, E.; Beig, M. I.; Menezes, G. B.; Cara, D. C.; Campagnole-Santos, M. J.; Fontes, M. A. P. Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* **2009**, *164*, 1360–1368, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.018.
- 324. Xavier, C. H.; Ianzer, D.; Lima, A. M.; Marins, F. R.; Pedrino, G. R.; Vaz, G.; Menezes, G. B.; Nalivaiko, E.; Fontes, M. A. P. Excitatory amino acid receptors mediate asymmetry and lateralization in the descending cardiovascular pathways from the dorsomedial hypothalamus. *PLoS One* **2014**, *9*, e112412, doi:10.1371/journal.pone.0112412.
- 325. Kolb, B.; Sutherland, R. J.; Nonneman, A. J.; Whishaw, I. Q. Asymmetry in the cerebral hemispheres of the rat, mouse, rabbit, and cat: The right hemisphere is larger. *Exp. Neurol.* **1982**, *78*, 348–359, doi:10.1016/0014-4886(82)90053-X.
- 326. Diamond, M. C.; Murphy, G. M.; Akiyama, K.; Johnson, R. E. Morphologic hippocampal asymmetry in male and female rats. *Exp. Neurol.* **1982**, *76*, 553–565, doi:10.1016/0014-4886(82)90124-8.
- 327. Diamond, M. C.; Dowling, G. A.; Johnson, R. E. Morphologic cerebral cortical asymmetry in male and female rats. *Exp. Neurol.* **1981**, *71*, 261–268, doi:10.1016/0014-4886(81)90087-X.
- 328. Gerendai, I.; Halász, B. Asymmetry of the neuroendocrine system. *News Physiol. Sci.* **2001**, *16*, 92–5.
- 329. Rodríguez-Medina, M. A.; Reyes, A.; Chavarría, M. E.; Vergara-Onofre, M.; Canchola, E.; Rosado, A. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus: Role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *72*, 189–195, doi:10.1016/S0091-3057(01)00755-9.
- 330. Ramírez, M.; Prieto, I.; Vives, F.; de Gasparo, M.; Alba, F. Neuropeptides, neuropeptidases and brain asymmetry. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 497–506, doi:10.2174/1389203043379350.

331. Zhang, Z.; Oppenheimer, S. M. Characterization, distribution and lateralization of baroreceptor-related neurons in the rat insular cortex. *Brain Res.* **1997**, *760*, 243–250, doi:10.1016/S0006-8993(97)00284-9.
332. Kamosinska, B.; Nowicki, D.; Szulczyk, P. Control of the heart rate by sympathetic nerves in cats. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1989**, *26*, 241–9, doi:10.1016/0165-1838(89)90173-2.
333. Furukawa, Y.; Wallick, D. W.; Martin, P. J.; Levy, M. N. Chronotropic and dromotropic responses to stimulation of intracardiac sympathetic nerves to sinoatrial or atrioventricular nodal region in anesthetized dogs. *Circ. Res.* **1990**, *66*, 1391–1399, doi:10.1161/01.RES.66.5.1391.
334. Esler, M. D.; Jennings, G. L.; Lambert, G. W. Release of noradrenaline into the cerebrovascular circulation in patients with primary hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* **1988**, *6*, S494–6.
335. Zhang, Z. H.; Dougherty, P. M.; Oppenheimer, S. M. Characterization of baroreceptor-related neurons in the monkey insular cortex. *Brain Res.* **1998**, *796*, 303–306, doi:10.1016/S0006-8993(98)00268-6.
336. Dong, J.; Mrabet, O.; Moze, E.; Li, K.; Neveu, P. J. Lateralization and catecholaminergic neuroimmunomodulation: Prazosin, an  $\alpha_1/\alpha_2$ -adrenergic receptor antagonist, suppresses interleukin-1 and increases interleukin-10 production induced by lipopolysaccharides. *Neuroimmunomodulation* **2002**, *10*, 163–168, doi:10.1159/000067178.
337. Guil, M. J. Interacción endotelinas-transmisión noradrenérgica central en ratas hipertensas DOCA-sal. Implicancias de los receptores ET-A Y ET-B, Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, 2017.
338. ICLAS, C. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals: December 2012. **2013**, 1–4.
339. Garber, J.; Barbee, R.; Bielitzki, J.; Clayton, L.; Donovan, J.; Hendriksen, C.; Kohn, D.; Lipman, N.; Locke, P.; Melcher, J.; Quimby, F.; Turner, P.; Wood, G.; Wurbel, H. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*; National Academies Press

(US), 2011; Vol. 8; ISBN 978-0-309-15400-0.

340. Cabral, A. M.; Silva, I. F.; Gardioli, C. R.; Mauad, H.; Vasquez, E. C. Diverse effects of renal denervation on ventricular hypertrophy and blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1998**, *31*, 587–90.
341. Brower, M.; Grace, M.; Kotz, C. M.; Koya, V. Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Lab. Anim. Res.* **2015**, *31*, 166, doi:10.5625/lar.2015.31.4.166.
342. Harlan Sprague Dawley® Rat. *Harlan* **1980**, 3–4.
343. Waynforth, H. B.; Flecknell, P. *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*; Academic Press, 1992; ISBN 9780127388519.
344. Joshi, M. D.; Oesterling, B. M.; Wu, C.; Gwizdz, N.; Pais, G.; Briyal, S.; Gulati, A. Evaluation of liposomal nanocarriers loaded with ETB receptor agonist, IRL-1620, using cell-based assays. *Neuroscience* **2016**, *312*, 141–152, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.016.
345. Verheyden, P.; Van Assche, I.; Brichard, M. H.; Demaude, T.; Paye, I.; Scarso, A.; Van Binst, G. Conformational study of three endothelin antagonists with 1H NMR at low temperature and molecular dynamics. *FEBS Lett.* **1994**, *344*, 55–60.
346. Cirak, B.; Kiyamaz, N.; Ari, H. H.; Ugras, S. The effects of endothelin antagonist BQ-610 on cerebral vascular wall following experimental subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Clin. Auton. Res.* **2004**, *14*, 197–201, doi:10.1007/s10286-004-0190-2.
347. Rodríguez, M. R.; Sabbatini, M. E.; Santella, G.; Vescina, C.; Vatta, M. S.; Bianciotti, L. G. Vagally mediated cholestatic and choleretic effects of centrally applied Endothelin-1 through ETA receptors. *Regul. Pept.* **2006**, *135*, 54–62, doi:10.1016/j.regpep.2006.04.001.
348. Briyal, S.; Nguyen, C.; Leonard, M.; Gulati, A. Stimulation of endothelin B receptors by IRL-1620 decreases the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **2015**, *301*, 1–11, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.044.

349. Dashwood, M. R.; Loesch, A. Endothelin-1 as a neuropeptide: Neurotransmitter or neurovascular effects? *J. Cell Commun. Signal.* 2010, **4**, 51–62.
350. Guo, Q.; Feng, X.; Xue, H.; Teng, X.; Jin, S.; Duan, X.; Xiao, L.; Wu, Y. Maternal Renovascular Hypertensive Rats Treatment With Hydrogen Sulfide Increased the Methylation of AT1b Gene in Offspring. *Am. J. Hypertens.* **2017**, **30**, 1220–1227, doi:10.1093/ajh/hpx124.
351. Niazi, Z. R.; Silva, G. C.; Ribeiro, T. P.; León-González, A. J.; Kassem, M.; Mirajkar, A.; Alvi, A.; Abbas, M.; Zgheel, F.; Schini-Kerth, V. B.; Auger, C. EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress. *Hypertens. Res.* **2017**, **40**, 966, doi:10.1038/hr.2017.72.
352. Zhou, Z.; Yadav, V. R.; Sun, C.; Teng, B.; Mustafa, J. S. Impaired Aortic Contractility to Uridine Adenosine Tetraphosphate in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice: Receptor Desensitization? *Am. J. Hypertens.* **2017**, **30**, 304–312, doi:10.1093/ajh/hpw163.
353. Altoama, K.; Mallem, M. Y.; Thorin, C.; Betti, E.; Desfontis, J. C. Effect of nebivolol treatment during pregnancy on the intrauterine fetal growth, mortality and pup postnatal development in the L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, **791**, 465–472, doi:10.1016/j.ejphar.2016.09.028.
354. Carlisle, R. E.; Werner, K. E.; Yum, V.; Lu, C.; Tat, V.; Memon, M.; No, Y.; Ask, K.; Dickhout, J. G. Endoplasmic reticulum stress inhibition reduces hypertension through the preservation of resistance blood vessel structure and function. *J. Hypertens.* **2016**, **34**, 1556–1569, doi:10.1097/HJH.0000000000000943.
355. Kurtz, T. W.; Griffin, K. A.; Bidani, A. K.; Davisson, R. L.; Hall, J. E. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals. A statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American heart a. *Hypertension* **2005**, **45**, 299–310, doi:10.1161/01.HYP.0000150857.39919.cb.

356. Whitesall, S. E.; Hoff, J. B.; Vollmer, A. P.; D'Alecy, L. G. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2004**, *286*, H2408–H2415, doi:10.1152/ajpheart.01089.2003.
357. van den Buuse, M. Circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radiotelemetry. *Physiol. Behav.* **1994**, *55*, 783–787, doi:10.1016/0031-9384(94)90060-4.
358. Guimaraes, P. S.; Santiago, N. M.; Xavier, C. H.; Velloso, E. P. P.; Fontes, M. A. P.; Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H393–H400, doi:10.1152/ajpheart.00075.2012.
359. Chugh, P. K.; Gupta, M.; Agarwal, M.; Tekur, U. Etoricoxib attenuates effect of antihypertensives in a rodent model of DOCA-salt induced hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **2013**, *35*, 601–606, doi:10.3109/10641963.2013.776567.
360. Singh, Y.; Singh, K.; Sharma, P. L. Effect of combination of renin inhibitor and Mas-receptor agonist in DOCA-salt-induced hypertension in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *373*, 189–194, doi:10.1007/s11010-012-1489-2.
361. Yuan, W.; Yu, Y.; Li, J.; Singh, P.; Li, D.; Gui, Y.; Zheng, X. L. Estrogen metabolite 2-methoxyestradiol prevents hypertension in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2013**, *27*, 17–22, doi:10.1007/s10557-012-6428-7.
362. Reinhard, J. F.; Smith, G. K.; Nichol, C. A. A rapid and sensitive assay for tyrosine-3-monooxygenase based upon the release of  $3H_2O$  and adsorption of  $[3H]$ -tyrosine by charcoal. *Life Sci.* **1986**, *39*, 2185–9.
363. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–54.
364. Field, A. *Discovering Statistics Using SPSS*; 2009; ISBN “9781847879066.”

365. Azar, T. A.; Sharp, J. L.; Lawson, D. M. Effects of Cage Enrichment on Heart Rate, Blood Pressure, and Activity of Female Sprague-Dawley and Spontaneously Hypertensive Rats at Rest and after Acute Challenges. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2012**, *51*, 339–344.
366. Azar, T.; Sharp, J.; Lawson, D. Heart rates of male and female Sprague-Dawley and spontaneously hypertensive rats housed singly or in groups. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2011**, *50*, 175–84.
367. Matsumura, Y.; Kuro, T.; Kobayashi, Y.; Konishi, F.; Takaoka, M.; Wessale, J. L.; Opgenorth, T. J.; Garipey, C. E.; Yanagisawa, M. Exaggerated vascular and renal pathology in endothelin-B receptor-deficient rats with deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Circulation* **2000**, *102*, 2765–73, doi:10.1161/01.CIR.102.22.2765.
368. Lee, L.-K.; Kim, M.-Y.; Kim, J.-H.; Lee, J.-U.; Park, B.-S.; Yang, S.-M.; Jeon, H.-J.; Lee, W.-D.; Noh, J.-W.; Kwak, T.-Y.; Lee, T.-H.; Kim, J.-Y.; Kim, H.-Y.; Hwang, B.-Y.; Kim, B.; Kim, J. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *J. Phys. Ther. Sci.* **2015**, *27*, 303–307, doi:10.1589/jpts.27.303.
369. Fink, G. D.; Johnson, R. J.; Galligan, J. J. Mechanisms of increased venous smooth muscle tone in desoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* **2000**, *35*, 464–469.
370. Takeda, K.; Nakamura, Y.; Oguro, M.; Kawasaki, S.; Hayashi, J.; Tanabe, S.; Nakata, T.; Lee, L. C.; Sasaki, S.; Nakagawa, M. Central attenuation of baroreflex precedes the development of hypertension in doca - salt-treated rats. *Am. J. Hypertens.* **1988**, *1*, 23S–25S, doi:10.1093/ajh/1.3.23S.
371. Takeda, K.; Nakamura, Y.; Hayashi, J.; Kawasaki, S.; Nakata, T.; Oguro, M.; Sasaki, S.; Nakagawa, M. Effects of salt and DOCA on hypothalamic and baroreflex control of blood pressure. *Clin. Exp. Hypertens. A.* **1988**, *10 Suppl 1*, 289–99.
372. Wang, D.-S.; Xie, H.-H.; Shen, F.-M.; Cai, G.-J.; Su, D.-F. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive

- rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, *32*, 545–52, doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04229.x.
373. Schenk, J.; McNeill, J. H. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1992**, *27*, 161–170, doi:10.1016/1056-8719(92)90036-Z.
  374. Lariviere, R.; Thibault, G.; Schiffrin, E. L. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1993**, *21*, 294–300, doi:10.1161/01.HYP.21.3.294.
  375. Schiffrin, E. L.; Larivière, R.; Li, J. S.; Sventek, P.; Touyz, R. M. Deoxycorticosterone Acetate Plus Salt Induces Overexpression of Vascular Endothelin-1 and Severe Vascular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **1995**, *25*, 769 LP-773.
  376. Li, J. S.; Larivière, R.; Schiffrin, E. L. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* **1994**, *24*, 183–188, doi:10.1161/01.HYP.24.2.183.
  377. Doucet, J.; Gonzalez, W.; Michel, J. B. Endothelin antagonists in salt-dependent hypertension associated with renal insufficiency. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1996**, *27*, 643–651, doi:10.1097/00005344-199605000-00005.
  378. Sventek, P.; Turgeon, A.; Garcia, R.; Schiffrin, E. L. Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Goldblatt hypertension. *J.Hypertens.* **1996**, *14*, 57–64.
  379. Sharifi, A. M.; He, G.; Touyz, R. M.; Schiffrin, E. L. Vascular endothelin-1 expression and effect of an endothelin ETA antagonist on structure and function of small arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **1998**, *31 Suppl 1*, S309–S312.
  380. Schiffrin, E. L. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension.

*Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **1999**, 34, 876–81.

381. Feldstein, C.; Romero, C. Role of endothelins in hypertension. In *American Journal of Therapeutics*; 2007; Vol. 14, pp. 147–153.
382. Horie, K.; Morita, A.; Yokogoshi, H. Endothelin-1 and endothelin-3 modulate dopaminergic neurons through different mechanisms. *Life Sci.* **1995**, 57, 735–741, doi:10.1016/0024-3205(95)02002-Z.
383. Lehmann, L. H.; Rostovsky, J. S.; Buss, S. J.; Kreusser, M. M.; Krebs, J.; Mier, W.; Enseleit, F.; Spiger, K.; Hardt, S. E.; Wieland, T.; Haass, M.; Lüscher, T. F.; Schneider, M. D.; Parlato, R.; Gröne, H.-J.; Haberkorn, U.; Yanagisawa, M.; Katus, H. A.; Backs, J. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111, 13499–13504, doi:10.1073/pnas.1409026111.
384. Piechota, A.; Polańczyk, A.; Goraca, A. Role of endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and oxidative stress. *Pharmacol. Reports* 2010, 62, 28–34.
385. Boesen, E. I.; Pollock, J. S.; Pollock, D. M. Contrasting effects of intervention with ETA and ETB receptor antagonists in hypertension induced by angiotensin II and high-salt diet. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2010**, 88, 802–807, doi:10.1139/Y10-051.
386. Elmarakby, A. A.; Loomis, E. D.; Pollock, J. S.; Pollock, D. M. ETA receptor blockade attenuates hypertension and decreases reactive oxygen species in ETB receptor-deficient rats. In *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 2004; Vol. 44, pp. S7-10.
387. Schiffrin, E. L.; Turgeon, A.; Deng, L. Y. Effect of chronic ET A -selective endothelin receptor antagonism on blood pressure in experimental and genetic hypertension in rats. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 121, 935–940, doi:10.1038/sj.bjp.0701224.
388. D’Amico, M.; Berrino, L.; Maione, S.; Filippelli, A.; Pizzirusso, A.; Vitagliano, S.; Rossi, F. Endothelin-1 in rat periaqueductal gray area induces hypertension via

- glutamatergic receptors. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **1995**, 25, 507–10.
389. Gulati, a; Rebello, S.; Roy, S.; Saxena, P. R. Cardiovascular effects of centrally administered endothelin-1 in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1995**, 26 Suppl 3, S244-6, doi:10.1016/0024-3205(95)02309-7.
  390. Chen, A. D.; Xiong, X. Q.; Gan, X. B.; Zhang, F.; Zhou, Y. B.; Gao, X. Y.; Han, Y. Endothelin-1 in paraventricular nucleus modulates cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rats. *PLoS One* **2012**, 7, e40748, doi:10.1371/journal.pone.0040748.
  391. Rebello, S.; Roy, S.; Saxena, P. R.; Gulati, A. Systemic hemodynamic and regional circulatory effects of centrally administered endothelin-1 are mediated through ETAreceptors. *Brain Res.* **1995**, 676, 141–150, doi:10.1016/0006-8993(95)00107-2.
  392. Kumar, A.; Morrison, S.; Gulati, A. Effect of ET(A) receptor antagonists on cardiovascular responses induced by centrally administered sarafotoxin 6b: Role of sympathetic nervous system. *Peptides* **1997**, 18, 855–864, doi:10.1016/S0196-9781(97)00009-0.
  393. Bruno, R. M.; Sudano, I.; Ghiadoni, L.; Masi, L.; Taddei, S. Interactions between sympathetic nervous system and endogenous endothelin in patients with essential hypertension. *Hypertension* **2011**, 57, 79–84, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163584.
  394. Maguire, J. J. Evidence for biased agonists and antagonists at the endothelin receptors. *Life Sci.* **2016**, 159, 30–33, doi:10.1016/j.lfs.2016.02.069.
  395. Leonard, M. G.; Gulati, A. Endothelin B receptor agonist, IRL-1620, enhances angiogenesis and neurogenesis following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **2013**, 1528, 28–41, doi:10.1016/j.brainres.2013.07.002.
  396. Briyal, S.; Shepard, C.; Gulati, A. Endothelin receptor type B agonist, IRL-1620, prevents beta amyloid (A $\beta$ ) induced oxidative stress and cognitive impairment in normal and diabetic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2014**, 120, 65–72, doi:10.1016/j.pbb.2014.02.008.

397. Canavan, S. V.; Mayes, L. C.; Treloar, H. B. Changes in maternal gene expression in olfactory circuits in the immediate postpartum period. *Front. Psychiatry* **2011**, *2*, 40, doi:10.3389/fpsyt.2011.00040.
398. Kohan, D. E.; Inscho, E. W.; Wesson, D.; Pollock, D. M. Physiology of endothelin and the kidney. *Compr. Physiol.* 2011, *1*, 883–919.
399. Westerhout, J.; Ploeger, B.; Smeets, J.; Danhof, M.; de Lange, E. C. M. Physiologically based pharmacokinetic modeling to investigate regional brain distribution kinetics in rats. *AAPS J.* **2012**, *14*, 543–53, doi:10.1208/s12248-012-9366-1.
400. Freedman, N. J.; Lefkowitz, R. J. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* **1996**, *51*, 313–319.
401. Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 1–24.
402. Gainetdinov, R. R.; Premont, R. T.; Bohn, L. M.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. Desensitization of G Protein–Coupled Receptors and Neuronal Functions. *Annu. Rev. Neurosci.* **2004**, *27*, 107–144, doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206.
403. Gärtner, F.; Seidel, T.; Schulz, U.; Gummert, J.; Milting, H. Desensitization and internalization of endothelin receptor  $\alpha$ ; Impact of g protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 32138–32148, doi:10.1074/jbc.M113.461566.
404. Gao, Y. J. Desensitization of vascular endothelin receptors by G protein-coupled receptor kinase 2. *Cardiovasc Res* **2010**, *85*, 405–406, doi:cvp392 [pii]\r10.1093/cvr/cvp392.
405. Ono, K.; Sakamoto, A.; Masaki, T.; Satake, M. Desensitization of ET(A) endothelin receptor-mediated negative chronotropic response in right atria - Species difference and intracellular mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 787–797, doi:10.1038/sj.bjp.0702125.

406. Cramer, H.; Müller-Esterl, W.; Schroeder, C. Subtype-specific desensitization of human endothelin ET(A) and ET(B) receptors reflects differential receptor phosphorylation. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13325–13332, doi:10.1021/bi9708848.
407. Cramer, H.; Muller-Esterl, W.; Schroeder, C. Subtype-specific endothelin-A and endothelin-B receptor desensitization correlates with differential receptor phosphorylation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31 Suppl 1*, S203–S206.
408. Himeno, A.; Shigematsu, K.; Taguchi, T.; Niwa, M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: Interaction in the recognition of endothelin-1 between ET(A) and ET(B) receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1998**, *18*, 447–552, doi:10.1023/A:1022557717481.
409. Davenport, A. P.; O'Reilly, G.; Kuc, R. E. Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *114*, 1110–6, doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb13322.x.
410. Hofman, M. A. On the evolution and geometry of the brain in mammals. *Prog. Neurobiol.* 1989, *32*, 137–158.
411. Finlay, B. L.; Hinz, F.; Darlington, R. B. Mapping behavioural evolution onto brain evolution: the strategic roles of conserved organization in individuals and species. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2011**, *366*, 2111–2123, doi:10.1098/rstb.2010.0344.
412. Finlay, B.; Darlington, R. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science (80-. ).* **1995**, *268*, 1578–1584, doi:10.1126/science.7777856.
413. Nummela, S.; Pihlström, H.; Puolamäki, K.; Fortelius, M.; Hemilä, S.; Reuter, T. Exploring the mammalian sensory space: Co-operations and trade-offs among senses. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **2013**, *199*, 1077–1092, doi:10.1007/s00359-013-0846-2.
414. McGann, J. P. Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science (80-. ).* 2017, *356*, eaam7263.

415. Passáli, G. C.; Ralli, M.; Galli, J.; Caló, L.; Paludetti, G. How relevant is the impairment of smell for the quality of life in allergic rhinitis? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2008, *8*, 238–242.
416. Henkin, R. I. Effects of smell loss (hyposmia) on salt usage. *Nutrition* **2014**, *30*, 690–695, doi:10.1016/j.nut.2013.11.003.
417. Oka, H.; Toyoda, C.; Yogo, M.; Mochio, S. Olfactory dysfunction and cardiovascular dysautonomia in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **2010**, *257*, 969–976, doi:10.1007/s00415-009-5447-1.
418. Attems, J.; Walker, L.; Jellinger, K. A. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 2014, *127*, 459–475.
419. Daulatzai, M. A. Olfactory dysfunction: its early temporal relationship and neural correlates in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 2015, *122*, 1475–1497.
420. Klingelhoefer, L.; Reichmann, H. Pathogenesis of Parkinson disease - The gut-brain axis and environmental factors. *Nat. Rev. Neurol.* 2015, *11*, 625–636.
421. Ajmani, G. S.; Suh, H. H.; Pinto, J. M. Effects of ambient air pollution exposure on olfaction: A review. *Environ. Health Perspect.* 2016, *124*, 1683–1693.
422. Sarnat, H. B.; Flores-Sarnat, L. Might the olfactory bulb be an origin of olfactory auras in focal epilepsy? *Epileptic Disord.* 2016, *18*, 344–355.
423. Yuan, T. F.; Slotnick, B. M. Roles of olfactory system dysfunction in depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 2014, *54*, 26–30.
424. Croy, I.; Hummel, T. Olfaction as a marker for depression. *J. Neurol.* 2017, *264*, 631–638.
425. Negoias, S.; Hummel, T.; Symmank, A.; Schellong, J.; Joraschky, P.; Croy, I. Olfactory bulb volume predicts therapeutic outcome in major depression disorder. *Brain Imaging Behav.* **2016**, *10*, 367–372, doi:10.1007/s11682-015-9400-x.
426. Negoias, S.; Croy, I.; Gerber, J.; Puschmann, S.; Petrowski, K.; Joraschky, P.;

- Hummel, T. Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience* **2010**, *169*, 415–421, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.05.012.
427. Yaldizli, Penner, I. K.; Yonekawa, T.; Naegelin, Y.; Kuhle, J.; Pardini, M.; Chard, D. T.; Stippich, C.; Kira, J. I.; Bendfeldt, K.; Amann, M.; Radue, E. W.; Kappos, L.; Sprenger, T. The association between olfactory bulb volume, cognitive dysfunction, physical disability and depression in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **2016**, *23*, 510–519, doi:10.1111/ene.12891.
428. Hare, D. L.; Toukhsati, S. R.; Johansson, P.; Jaarsma, T. Depression and cardiovascular disease: A clinical review. *Eur. Heart J.* 2014, *35*, 1365–1372.
429. Nicholson, A.; Kuper, H.; Hemingway, H. Depression as an aetiological and prognostic factor in coronary heart disease: A meta-analysis of 6362 events among 146 538 participants in 54 observational studies. *Eur. Heart J.* **2006**, *27*, 2763–2774, doi:10.1093/eurheartj/ehl338.
430. Moreau, P. Endothelin in hypertension: a role for receptor antagonists? *Cardiovasc. Res.* **1998**, *39*, 534–42.
431. Mortensen, L.; Fink, G. Salt-dependency of endothelin-induced, chronic hypertension in conscious rats. *Hypertension* **1992**, *19*, 549–554, doi:10.1161/01.HYP.19.6.549.
432. Meyers, K. E. C.; Sethna, C. Endothelin antagonists in hypertension and kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2013, *28*, 711–720.