



**UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

***“RESPUESTAS RENALES A LA ANGIOTENSINA II EN LA
DIABETES MELLITUS TIPO 1 E HIPERTENSIÓN ARTERIAL
SECUNDARIA”***

TESIS QUE PRESENTA EL:

Q.F.B. FELIPE FRANCISCO RIVERA JARDÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

DIRECTORES DE LA TESIS:

**Dr. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ
Dr. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**

Morelia, Michoacán.

Febrero de 2010

La realización de esta tesis fue asesorada por el D. C. Daniel Godínez Hernández en el laboratorio de Farmacología del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

La parte experimental de esta investigación se realizó en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM bajo la asesoría del D. C. Maximiliano Ibarra Barajas.

Durante este trabajo se contó con la beca de Maestría 230286/213024 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Y también fue apoyada por PAPIIT IN223009, DGAPA UNAM y PAPCA 2009 FES-Iztacala UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

El D. C. Daniel Godínez Hernández y el D. C. Maximiliano Ibarra Barajas por sus contribuciones en mi formación profesional y por su sincera amistad.

A mis sinodales:

M.C. Héctor Urquiza Marín, D. C. Alfredo Saavedra Molina y el D. C. Salvador Manzo Ávalos, por sus aportaciones que fortalecieron en gran medida este trabajo de investigación.

Al equipo de trabajo del laboratorio del Dr. Max: Itzell, Paty y Juan Javier, quienes amablemente contribuyeron con sus conocimientos a la realización experimental de esta tesis.

A cada uno de mis amigos y amigas sinceros, que me acompañan en las buenas y malas. A Yolanda por ser muy especial.

A Dios y a la vida.... por lo aprendido y lo que sigue.....

DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente trabajo a mi familia por todo el apoyo incondicional que me dan día a día, y que gracias a ellos puedo hoy obtener un logro más en mi vida, sin el apoyo de mis papás y hermanos no hubiese sido posible realizarlo y recordarles que siempre lo más importante en mi vida es mi querida familia, sin ellos sería muy poco.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

Índice general.....	IV
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	IX

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1. Diabetes Mellitus: definición y clasificación.....	01
1.2. Diagnóstico de Diabetes Mellitus.....	02
1.3. Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	03
1.3.1. Diabetes Mellitus tipo 1.....	03
1.3.2. Diabetes Mellitus tipo 2.....	03
1.3.3. Otros tipos específicos de diabetes.....	04
1.4. Hipertensión arterial: definición y clasificación.....	05
1.5. Perspectiva actual de las enfermedades cardiovasculares.....	08
1.6. Complicaciones de la diabetes asociada con hipertensión.....	09
1.7. Anatomía y fisiología del riñón.....	12
1.7.1. La nefrona.....	15
1.7.2. Formación de orina en el riñón.....	16
1.7.3. Regulación de la presión arterial por los riñones.....	17
1.7.4. Síntesis de angiotensina II.....	20
1.7.5. Los receptores a la angiotensina II.....	21
a) El receptor AT ₁	21
b) El receptor AT ₂	22
1.8. Presión de perfusión renal.....	22
1.9. Participación del Sistema Renina Angiotensina en la Diabetes Mellitus e hipertensión arterial.....	23
1.10. Papel del óxido nítrico en la diabetes e hipertensión.....	26
a) Deficiencia de óxido nítrico en la Diabetes Mellitus y en la hipertensión arterial.....	27
b) El óxido nítrico en el riñón.....	29
1.11. Hipertensión por deficiencia de óxido nítrico.....	30
2. JUSTIFICACIÓN.....	32

3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. General.....	33
4.2. Particulares.....	33
CAPÍTULO II	
5. METODOLOGÍA	34
5.1. Protocolo experimental.....	34
5.2. Desarrollo de los modelos experimentales.....	34
5.2.1. Inducción de la hipertensión arterial (HA).....	34
5.2.2. Inducción de la Diabetes Mellitus (DM).....	35
5.2.3. Inducción de la Diabetes-hipertensión (DM-HA).....	35
5.3. Preparación del tejido.....	35
5.4. Reactivos.....	36
5.5. Curvas concentración-respuesta a la angiotensina II.....	36
5.6. Análisis por Western blot del receptor AT ₁ en corteza y médula renales	
a) Homogenización.....	38
b) Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.....	38
c) Electroforesis.....	38
d) Transferencia de la proteína a una membrana de fluoruro de polivinildieno (PVDF).....	39
e) Reacción quimioluminiscente.....	40
5.7. Análisis estadístico.....	41
CAPÍTULO III	
6. RESULTADOS	42
6.1. Peso corporal.....	42
6.2. Ingesta de agua.....	43
6.3. Glucosa sanguínea.....	44
6.4. Presión arterial.....	45
6.5. Coeficiente de masa renal.....	46
6.6. Presión basal de perfusión.....	47
6.7. Contracción con K ⁺ en solución Krebs-Henseleit 80 mM.....	48
6.8. Curva concentración-respuesta a la angiotensina II.....	49
6.9. Antagonismo de losartán.....	50
6.10. Determinación de la expresión del receptor AT ₁ en el riñón.....	52
CAPÍTULO IV	
7. DISCUSIÓN	54

7.1. Resumen de resultados.....	54
7.2. Hipersensibilidad a la angiotensina II.....	55
7.3. Efecto de losartán sobre la curva concentración-respuesta a la angiotensina II.....	58
7.4. Expresión del receptor AT ₁ en corteza y médula renales.....	58
7.5. Coeficiente de masa renal.....	60
7.6. Presión basal de perfusión alterada.....	62
8. CONCLUSIÓN.....	68
9. REFERENCIAS.....	69
10. ANEXO.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Corte longitudinal del riñón.....	14
Figura 2. Esquema de las dos principales tipos de nefrona.....	15
Figura 3. Vía clásica del sistema renina angiotensina.....	19
Figura 4. Curso temporal del peso corporal.....	42
Figura 5. Curso temporal de la ingesta de agua.....	43
Figura 6. Curso temporal de la glucosa sanguínea.....	44
Figura 7. Coeficiente de masa renal.....	46
Figura 8. Presión basal de perfusión.....	47
Figura 9. Normalización de la presión de perfusión con K ⁺ en solución Krebs-Henseleit 80mM.....	48
Figura 10. Curva concentración-respuesta a la angiotensina II en riñón aislado y perfundido.....	50
Figura 11. Efecto de losartán sobre la curva concentración-respuesta a la angiotensina II.....	51
Figura 12. Determinación del receptor AT ₁ por medio de Western Blot.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre DM1 y DM2.....	04
Tabla 2. Valores de presión arterial sistólica y diastólica.....	06
Tabla 3. Principales funciones del riñón.....	13
Tabla 4. Registro de la presión arterial sistólica y diastólica.....	45
Tabla 5. Valores de sensibilidad y efecto máximo.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG I.....	Angiotensina I
ANG II.....	Angiotensina II
ARA's.....	Antagonistas del receptor a angiotensina
AT ₁	Receptor tipo 1 a la angiotensina II
AT ₂	Receptor tipo 2 a la angiotensina II
DM.....	Diabetes Mellitus
DM1.....	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2.....	Diabetes Mellitus tipo 2
ECA.....	Enzima convertidora de angiotensina
ECA2.....	Enzima convertidora de angiotensina tipo 2
ECV.....	Enfermedades cardiovasculares
E _{max}	Efecto máximo
HA.....	Hipertensión arterial
IECA's.....	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
L-NAME.....	N _ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrocioruro
NOS.....	Óxido nítrico sintasa
ON.....	Óxido nítrico
pD ₂	Sensibilidad (CE ₅₀)
PGI ₂	Prostaciclina
SRA.....	Sistema renina angiotensina
TFG.....	Tasa de filtración glomerular

RESUMEN

La hipertensión (HA) y la Diabetes (DM) son enfermedades que a menudo se presentan en conjunto, y además conllevan a complicaciones en órgano blanco como corazón, cerebro, riñón y vasculaturas, siendo las causas principales de mortalidad. Ambas patologías representan factores de riesgo a complicaciones cardiovasculares, asociadas a un riesgo incrementado de insuficiencia renal y nefropatía.

Uno de los sistemas implicados en regular la presión arterial es el Sistema Renina-Angiotensina renal, este controla la presión arterial tanto a corto como a largo plazo. La angiotensina II (ANG II) al ser el mediador más importante de este sistema, tiene una participación importante en la homeostasis renal y cardiovascular, mediando sus efectos fisiológicos y fisiopatológicos a través de dos tipos de receptores específicos, principalmente por el receptor AT_1 . Por lo que creemos que hay un aumento a la respuesta presora de la ANG II en etapas tempranas de la DM y la HA. Siendo así nuestro objetivo determinar la participación de la ANG II en el riñón en etapas tempranas en la DM y en la HA, para lo cual se evaluó cambios a la respuesta presora de ANGII en riñones de ratas con DM e HA, así como también se determinó la presencia del receptor AT_1 en riñones de ratas con DM e HA.

Se emplearon ratas Wistar de 200 a 250 g y se dividieron en 4 grupos: Control, Hipertensas (75 mg/kg/día L-NAME, durante 2 semanas), Diabéticas (Estreptozotocina 60 mg/kg i.p.) y Diabéticas-hipertensas. Se corrieron curvas concentración-respuesta a la ANG II en los riñones derechos en un sistema de órgano aislado tipo Langendorff, perfundido con solución de Krebs-Henseleit, a pH 7.4, burbujeada con carbógeno (95% de O_2 - 5% de CO_2) y mantenidos a 37 °C. Los riñones aislados de los animales se dividieron en corteza y médula renales y se utilizaron para la determinación del receptor AT_1 por la técnica de Western Blott.

El tratamiento hipertensivo produjo un aumento significativo de la presión arterial (Control: 120/80 Vs L-NAME: 140/120 $p < 0.05$), en tanto la Diabetes no es capaz de modificar dicho valor. La ANG II causa un incremento de la presión de perfusión renal dependiente de concentraciones crecientes de ANG II. La respuesta presora máxima fue observada en las ratas diabéticas-hipertensas (Control: 54.8 ± 3.8 mmHg Vs diabéticas-hipertensas: 65.5 ± 12 mmHg $p < 0.5$), así mismo también se observó una mayor sensibilidad a la ANG II en el grupo diabético-hipertenso (Control: 6.02 ± 0.3 Vs diabéticas-hipertensas: 7.2 ± 0.14 $p < 0.5$). El efecto antagonista de losartán causa que no haya diferencias en el efecto máximo, es decir, siempre llegaron al mismo efecto máximo. En tanto la sensibilidad (pD_2) a la ANG II no existe diferencia significativa entre grupos, sin embargo se puede observar un mayor antagonismo en el grupo diabético-hipertenso, sugiriendo que el receptor AT_1 del riñón tiene mayor sensibilidad al losartán. El análisis del receptor AT_1 de corteza y médula renales por Western Blot mostró que en el grupo diabético-hipertenso existe una disminución significativa en la expresión de este receptor.

En el presente estudio se demuestra que la administración crónica de L-NAME está asociada con una vasoconstricción aumentada a la ANG II. Así, nuestros resultados confirman reportes previos en el que el bloqueo crónico de ON produce activación del sistema renina angiotensina, que se involucra en el mantenimiento de la hipertensión, la Diabetes y la vasoconstricción renal

descrita en este modelo. Por otra parte, se muestra que el losartán, un antagonista selectivo para el receptor AT_1 , logra bloquear la respuesta renovascular a la ANG II. Este último dato en particular sugiere que el efecto vasopresor de ANG II está mediado principalmente por el receptor AT_1 .

El aumento en la vasoconstricción inducida por ANG II podría haber sido atribuida a un aumento en la expresión de los receptores AT_1 en el riñón. No obstante, nuestros datos revelan que el patrón de expresión no es uniforme en corteza y médula renales, así como entre grupos. La médula renal presenta un aumento de tres veces más la expresión del AT_1 respecto a la corteza de los grupos control respectivamente, evidenciando la participación que tiene la ANG II en este lecho anatómico en la regulación de la homeostasis renal y en la formación de una orina más concentrada. Además existe una menor expresión del AT_1 en el grupo diabético-hipertenso, indicando que pueden existir cambios en la afinidad del receptor o mecanismos de transducción de señal relacionados con la activación del receptor.

No descartamos una participación del receptor AT_2 en este comportamiento, ya que se ha reportado que la activación de este receptor produce dilatación arteriolar, proviendo un mecanismo contraregulatorio a la activación del AT_1 . Una menor expresión del AT_2 podría estar involucrada. En conclusión nuestros resultados muestran que la activación de los receptores AT_1 están asociados con una hipersensibilidad de la vasculatura renal en diabetes asociada con hipertensión.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DIABETES MELLITUS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

En la actualidad las naciones desarrolladas han sido testigos del incremento explosivo de la prevalencia de Diabetes Mellitus (DM), asociada con cambios en el modo y estilo de vida y con el aumento en la incidencia de obesidad que lleva consigo. Esta enfermedad representa un problema de salud pública en crecimiento por las complicaciones metabólicas asociadas a la hiperglucemia que incluyen: aterosclerosis, nefropatías crónicas y ceguera. Por lo tanto, es de suma importancia tomar el gran reto de ampliar los conocimientos sobre la fisiopatología de esta enfermedad, sus complicaciones, así como su prevención y tratamiento.

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa, caracterizada por hiperglucemia que resulta de los defectos en la secreción de la hormona insulina, la resistencia a su acción ó ambas cosas. En esta patología está alterado el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, principalmente (Expert committee on the diagnosis and treatment of Diabetes Mellitus, 2003).

El defecto en la secreción ó acción de la insulina puede ser debido a dos razones, principalmente. Primero, en alrededor del 90% de los diabéticos tipo 1, la DM puede asociarse a una enfermedad autoinmunitaria de las células β del páncreas, en la que se han encontrado anticuerpos dirigidos contra antígenos tanto citoplásmicos como membranales. Entre ellos se incluyen anticuerpos contra: células de los islotes, insulina (IAA), descarboxilasa de ácido glutámico 65 y 67 (GAD-65 y GAD-67), proteína de choque por calor 65

(HSP-65), albúmina de suero bovino y proteína parecida a la fosfatasa de tirosina (IA-2 ó IA-2B) (Stephen, 2007). Segundo, en el 90% del total de diabéticos la DM se ha asociado a la obesidad, en donde hay una resistencia a la insulina en los tejidos u órganos blanco, ya sea por falla en el acoplamiento a los receptores de insulina ó un defecto en la síntesis ó maduración de la misma.

Sin embargo, la mayoría de los casos de Diabetes Mellitus presentan un decremento en la concentración de insulina en la circulación y una disminución de la respuesta de los tejidos periféricos a esta sustancia (Stephen, 2007) que da como resultado un estado hiperglucémico. La hiperglucemia crónica resultante, que es la característica central del síndrome, se asocia con daño, disfunción ó insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Masharani *et al.*, 2006). Esta enfermedad es considerada de tipo epidémico y se estima que en el mundo tiene una prevalencia alta afectando a más de 240 millones de personas (Federación Internacional de Diabetes, 2007), y en México 6 millones de personas que son mayores de 20 años padece Diabetes (ENSA, 2005).

1.2. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MELLITUS

Los criterios para diagnosticar diabetes son: una glucemia casual, en cualquier momento del día sin importar el tiempo desde la última ingesta de alimento, mayor ó igual a 126 mg/dl en dos o más visitas al médico; los síntomas clásicos como poliuria, polidipsia y pérdida de peso (Masharani *et al.*, 2006). Existe un grupo intermedio de sujetos cuyo nivel de glucemia no es criterio para clasificarlo como diabetes, pero es muy alto para considerarlo

normal, dicho grupo se denomina como intolerancia a la glucosa; es decir, glucemia en ayuno mayor ó igual a 110 mm/dl y menor a 126 mg/dl, después de una sobrecarga de glucosa (75 g de glucosa disuelta en agua).

1.3. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

La gran mayoría de los casos de diabetes se agrupa en dos categorías:

1.3.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1:

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) se sabe que es de origen inmunitario en más de 90% de los casos e idiopática en menos de 10% (Masharani *et al.*, 2006). En esta forma de diabetes la tasa de destrucción de las células β pancreáticas es variable, es decir, rápida en niños y lenta en adultos, aún así los pacientes presentan tendencia a la cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad y la mayoría de los individuos clasificados en esta categoría dependen del tratamiento con insulina exógena para sobrevivir.

En este tipo de diabetes, la disfunción endotelial se mantiene y puede causar complicaciones microvasculares, no obstante, aún no está claro si la disfunción endotelial es una característica propia del estado diabético (Schalkwijk *et al.*, 2005).

1.3.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2:

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza por una resistencia a la insulina y deficiencia relativa de insulina. Esta patología incluye un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética, cuya contribución no está bien definida hasta la actualidad. En estos pacientes los

niveles de insulina plasmática son normales ó incluso elevados, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque con el tiempo muchos requieren insulina para su control, ella no es indispensable para preservar una buena calidad de vida. Existen reportes de una prevalencia alta de pacientes con DM2, sin embargo, hay un número importante de pacientes no diagnosticados, con una subestimación de 90%, es decir, por cada paciente diagnosticado hay 9 que aún no lo saben (Diamond, 2003; Zimmet *et al.*, 2001).

Tabla 1. Diferencias más relevantes entre las dos formas más comunes de Diabetes Mellitus (tipo 1 y tipo 2). (Modificada de Arias, 2003).

	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2
Distribución porcentual	Menos frecuente (5-10% de los casos)	Más frecuente (90-95% de los casos)
Mecanismo etiopatogénico	Destrucción autoinmune de las células β	Insulinorresistencia y falla secretoria de distintos grados
Inicio	Habitualmente es rápido, con síntomas muy marcados	Generalmente es lento e insidioso
Edad de aparición	Generalmente antes de los 20 años	Por lo común después de los 39 años
Peso corporal	En más del 80% de los casos el paciente es delgado	En más del 80% de los casos el paciente tiene sobrepeso
Tendencia a la cetosis	Constante en ausencia de tratamiento insulínico	Poco frecuente, asociada con infecciones, estrés, etc.
Tratamiento con insulina	Imprescindible para conservar la vida	Necesario en algunos casos para el control adecuado

1.3.3. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES:

En este grupo se engloba una serie de entidades de fisiopatología muy heterogénea. Estos tipos de diabetes, menos del 10% de los casos, presentan

variaciones dependientes de la causa subyacente. Incluyen pacientes con defectos genéticos que modifican la acción biológica de insulina a nivel receptor o post-receptor, como la forma llamada MODY (Matury Onset Diabetes of the Young); otros con patologías pancreáticas (pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas, hemocromatosis); endocrinopatías; agentes infecciosos ó fármacos que pueden producir diabetes secundaria.

1.4. HIPERTENSIÓN ARTERIAL: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

La hipertensión arterial (HA) representa un problema grave de salud pública al ser considerada como el primer factor de riesgo para sufrir enfermedad cardiovascular (ENSA, 2000), afectando a personas en edad productiva. Su importancia radica en las consecuencias sobre la esperanza y calidad de vida de quien la padece. En esta enfermedad, los pacientes cursan sin sintomatología hasta que aparecen una ó varias complicaciones, de ahí que se le llame el asesino silencioso. La prevalencia de hipertensión arterial en México resultó de 30.8% en personas mayores de 20 años de edad ó más (ENSANUT, 2006). Además, la prevalencia de HA aumenta con la edad, alcanzando cifras de alrededor del 50% de las personas mayores de 60 años (Hoffman, 2007).

La HA sistémica se define como un padecimiento crónico en el cual la característica principal es un aumento sostenido de la presión arterial por encima de 140/90 mmHg (JNC-7, 2003) y en adultos, el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular y renal relacionada con esta enfermedad es lo bastante alto para ameritar atención médica (Hoffman, 2007). La hipertensión

arterial es un desorden hemodinámico de las sustancias vasodilatadoras, de las vasoconstrictoras o ambas; que refleja un aumento en las resistencias vasculares periféricas (Sosa *et al.*, 2005).

Tabla 2. Valores de presión arterial sistólica y diastólica considerados en la clasificación de presión arterial. Modificada de JNC-7, 2003.

Clasificación	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)
Normal	<120	y	<80
Prehipertensión	120-139	ó	80-89
Estadio 1	140-159	ó	90-99
Estadio 2	≥160	ó	≥100

En el 90 % de los casos de HA, la causa es desconocida, por lo cual, se le ha denominado HA esencial, con una fuerte influencia hereditaria. En 5 a 10 % de los casos, existe una causa directamente responsable de la elevación de la presión arterial y a esta forma de HA se le denomina HA secundaria (Zenteno *et al.*, 2003). Sin embargo, en todas las formas de hipertensión, la resistencia periférica total está aumentada por múltiples factores, entre los que se incluyen: disfunción endotelial, que se caracteriza por una disminución de la función y/o la producción de óxido nítrico (ON) y prostaciclina (PGI₂), la elevación de los niveles plasmáticos de endotelina; la activación del sistema renina-angiotensina y un aumento de la angiotensina II (ANG II) circulante como agente vasoconstrictor; el incremento de catecolaminas y la viscosidad sanguínea; así como cambios estructurales de los vasos sanguíneos que consisten en la hipertrofia de la pared vascular y contribuyen a la disminución en el número y calibre de las células (Sosa *et al.*, 2005).

De acuerdo a la organización mundial de la salud, el peligro de enfermedad cardiovascular se incrementa de modo notable por tabaquismo, diabetes o aumento de las lipoproteínas de baja densidad; la coexistencia de hipertensión con estos factores de riesgo incrementa la morbilidad y mortalidad cardiovasculares a un grado que se complica por cada factor de riesgo adicional (Hoffman, 2007).

Las principales complicaciones de la hipertensión están relacionadas con elevaciones sostenidas de la presión arterial y en consecuencia, cambios en la vasculatura y el corazón (Cruz, 2001), por lo que el riesgo de una enfermedad cardiovascular, renal y otras enfermedades, es más bajo con presiones arteriales menores de 120/80 mmHg. Las recomendaciones acerca del tratamiento no farmacológico de la hipertensión incluyen: reducción del peso corporal, restricción de sodio, restricción de alcohol, ejercicio físico, reducción de estrés, tratamiento con potasio, evitar el consumo de tabaco, café y otros factores (Hoffman, 2007)

Aunque actualmente se realiza una gran cantidad de investigaciones sobre la HA, en más del 90% de los pacientes hipertensos no se encuentra una causa concreta, sin embargo, hay avances en el conocimiento de la participación del endotelio vascular y sus productos, los nexos fisiopatológicos con otras entidades como la Diabetes Mellitus y la obesidad a través de la resistencia a insulina y el papel de los distintos cationes (sodio, principalmente) en el desarrollo de la hipertensión arterial (Cruz, 2001).

1.5. PERSPECTIVA ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Por enfermedad cardiovascular (ECV) se entiende la enfermedad cardíaca secundaria a aterosclerosis que afecta las arterias coronarias que nutren al corazón y es causa de infarto al miocardio (OMS, 2007). En la actualidad, este tipo de enfermedades representan la principal causa de morbilidad y mortalidad en sociedades desarrolladas y ejercen un gran impacto en la salud individual y en costos altos de atención médica.

Las ECV son la primera causa de muerte a nivel mundial, afectan por igual a ambos sexos y más del 80% de los pacientes viven en países en vías de desarrollo, se estima que 17.5 millones de personas mueren cada año a causa de una enfermedad cardiovascular (OMS, 2007). Los factores de riesgo para padecer alguna ECV están bien definidos y son: la hipertensión arterial, la Diabetes Mellitus, la obesidad, el tabaquismo, el alcoholismo, el sedentarismo, así como el consumo excesivo de sal (ENSA, 2000).

Las enfermedades renales crónicas representan un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular independiente de los mencionados anteriormente (Elsayed *et al.*, 2007) y en México, existe una prevalencia alta de enfermedades renales crónicas, siendo los principales factores de riesgo la diabetes y la obesidad (Paniagua *et al.*, 2007). Uno de los principales mecanismos fisiopatológicos involucrados en las complicaciones cardiovasculares de las enfermedades renales es la disfunción endotelial (Schiffrin *et al.*, 2007) y se ha demostrado que la micro y macroalbuminuria son una expresión de la disfunción endotelial generalizada. La relación de enfermedades como la diabetes, la obesidad, la hipertensión, así como la

disfunción renal llevan a la activación del sistema renina-angiotensina (SRA), al aumento del estrés oxidativo, la inflamación de bajo grado con incremento en las citocinas circulantes y la dislipidemia. Todos estos mecanismos fisiopatológicos comunes están implicados en la asociación de insuficiencia renal y ECV (Schiffrin *et al.*, 2007).

1.6. COMPLICACIONES DE LA DIABETES ASOCIADA CON HIPERTENSIÓN

Tanto la diabetes como la hipertensión son enfermedades que predisponen independientemente a complicaciones cardiovasculares y renales, son consideradas como crónico-degenerativas, su evolución es silenciosa, son asintomáticas y cursan inadvertidas, en el inicio, hasta que el paciente acude al médico por una complicación de dicha enfermedad. Ambas enfermedades presentan una prevalencia alta en la población y es relativamente frecuente encontrarlas asociadas en un mismo paciente. La ENSA 2000 muestra que del total de la población hipertensa, existe un 16.4% de pacientes hipertensos que tuvo diagnóstico de diabetes, y de toda la población diabética el 46.2% tuvo hipertensión arterial (ENSA, 2000). Estos pacientes conforman un grupo de alto riesgo que representa un reto especial para su control médico por la susceptibilidad alta a eventos cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares y renales son la principal causa de muerte en personas con diabetes y algunos otros factores como la hipertensión contribuyen a que aumente esta prevalencia. Se ha observado que la hipertensión es aproximadamente dos veces mas frecuente en pacientes con diabetes comparado con los que no tienen esta enfermedad (Sowers *et al.*,

2001), aunque las personas con hipertensión tienen una prevalencia alta de resistencia a la insulina y un substancial riesgo incrementado para desarrollar DM2 (Sowers, 2004).

En la diabetes, el inicio de la hipertensión ocurre principalmente como una consecuencia de insuficiencia renal, es decir, el daño al riñón condiciona la presencia de hipertensión. Se ha reportado que la microalbuminuria, que es una anomalía de la función renal, se desarrolla antes de cualquier evidencia clínica de enfermedad cardíaca coronaria ó enfermedad vascular renal en pacientes que tienen diabetes con o sin hipertensión (Sowers et al., 2001). La microalbuminuria es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ECV y un predictor para la mortalidad cardiovascular en la población diabética (Sowers et al., 2001), además de ser la característica particular que parece acelerar el desarrollo de complicaciones microvasculares incluyendo nefropatía y retinopatía. Es evidente entonces, que el daño al riñón es un factor importante y una vez que el paciente con DM2 desarrolla proteinuria, el decline en la función renal parece ser inevitable (Deedwania, 2000). La microalbuminuria se correlaciona también con aterosclerosis y disfunción endotelial y tiene una contribución a la disfunción endotelial glomerular y generalizada (Deedwania, 2000).

Cuando existe diabetes con hipertensión se incrementa aún más el riesgo de la disminución de la función renal, ya que por un lado la hipertensión por si sola no causa una disminución significativa, y por otro lado la diabetes sola es la causa más común de enfermedades renales (Hassing *et al.*, 2004), es decir, la hipertensión acelera la tasa de disfunción renal en pacientes tanto con DM2 como con proteinuria (Deedwania, 2000; Sutters, 2008).

Alrededor del 40% de los casos de insuficiencia renal terminal se deben a la nefropatía diabética, caracterizada: por proteinuria, disminución de la tasa de filtración glomerular y un incremento en la presión arterial (Sowers, 2004), en tanto la hipertensión ocasiona otro 30%.

La historia familiar y la predisposición genética para la diabetes e hipertensión, se ha asociado con un perfil aterogénico de riesgo cardiovascular, con reflejo de adiposidad, concentraciones altas de triglicéridos y de colesterol total e hipertensión arterial (Braxton *et al.*, 1999). La aterosclerosis es la principal complicación macrovascular, responsable, de al menos la mitad, de las muertes en pacientes con DM2 (Deedwania, 2000).

Existen diversos reportes que indican la importancia del tratamiento adecuado en estos pacientes, en particular, mantener una presión arterial menor a 130/85 mmHg, con un óptimo de 120/80 mmHg y de esta manera se reduce en gran medida los riesgos de eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos con diabetes (JNC-6 1997; Sowers *et al.*, 2001). En este tipo de pacientes es más importante mantener un riguroso control de la presión arterial que el control estricto de la glucemia. Se ha observado que el uso de fármacos antihipertensivos se obtiene una disminución significativa del 34 % en el riesgo de eventos cardiovasculares. Los antihipertensivos que producen este beneficio son: los diuréticos tiazida, antagonistas beta-adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA's) y antagonistas del receptor a angiotensina AT₁ (ARA's) (Ross *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, lograr niveles de presión arterial bajos en este grupo de pacientes aporta beneficios, pero se ha observado que

el uso de fármacos que intervienen en el sistema renina angiotensina, como son: los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los antagonistas del receptor AT_1 e incluso los inhibidores de renina, otorgan un beneficio adicional, particularmente por su efecto renoprotector (Sowers, 2004). En este sentido, el tratamiento con captopril reduce un 50% los niveles de creatinina sérica en pacientes con DM2 (Sowers, 2004) y reduce significativamente la tasa de progresión de albuminuria (Deedwania, 2000). La terapia con diversos antagonistas del receptor AT_1 , como el losartán, fue asociada con una reducción del 28% del riesgo de insuficiencia renal terminal (Sowers, 2004). La elevación de los niveles de bradicinina, asociada con la inhibición de la ECA y la subsecuente producción estimulada de óxido nítrico, prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio puede contribuir a los beneficios clínicos de los IECA's, en tanto los ARA's pueden proveer renoprotección y cardioprotección en estos pacientes, de manera similar que los provistos por los IECA's (Deedwania, 2000).

1.7. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL RIÑÓN

El riñón es un órgano encargado de eliminar sustancias de desecho de la sangre y está diseñado para filtrar grandes cantidades de sangre, reabsorber sustancias que deben conservarse en el organismo y excretar los elementos que deben eliminarse.

Las funciones del riñón son numerosas como las que se resumen en la tabla 3 (Tomada de Guyton y Hall, 2006):

Los riñones se encuentran situados en la pared posterior del abdomen, por fuera de la cavidad peritoneal, uno a cada lado de la columna vertebral (Guyton y Hall, 2006).

Tabla 3. Principales funciones del riñón.

Excreción de los productos metabólicos de desecho y de las sustancias químicas extrañas Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico Regulación de la osmolalidad de los líquidos corporales y de las concentraciones de electrólitos Regulación del equilibrio ácido-básico Regulación de la presión arterial Secreción, metabolismo y excreción de hormonas Gluconeogénesis
--

La arteria renal principal se ramifica cerca del hilio renal en las arterias segmentarias, que a su vez, se subdividen para formar las arterias interlobulares que penetran al parénquima renal y forman una curva en el borde de la médula y la corteza renales para formar vasos parecidos a un arco, conocidos como arterias arciformes. Estas últimas dan lugar a ramas perpendiculares llamadas arterias interlobulillares que entran en la corteza renal y llevan sangre a las arteriolas aferentes. Una arteriola aferente única penetra al glomérulo de cada nefrona, y se ramifica de modo extenso para formar la red de capilares glomerulares. Esas ramas muestran coalescencia y constituyen la arteriola eferente. Las arteriolas eferentes de los glomérulos superficiales ascienden hacia la superficie renal, antes de dividirse en capilares peritubulares que riegan a los elementos tubulares de la corteza renal. Las arteriolas eferentes de los glomérulos yuxtamedulares descienden hacia la médula y se dividen constituyendo los vasos rectos descendentes, los cuales

suministran sangre a los capilares de la médula. La sangre que regresa desde esta última, por medio de los vasos rectos ascendentes, drena de manera directa hacia las venas arciformes, y la sangre que proviene de los capilares peritubulares de la corteza entra en las venas interlobulillares que, a su vez, se conectan con las venas arciformes, mismas que drenan hacia las venas interlobulares, las cuales drenan hacia las venas segmentarias; la sangre sale de los riñones por medio de la vena renal principal (Jackson, 2007).

Cuando se hace un corte longitudinal del riñón, se puede observar que está dividido en dos regiones principales: una interna llamada médula renal y una externa llamada corteza renal. La médula está formada por varias pirámides renales, los ápices de éstas se proyectan dentro de los cálices menores. El extremo de un ápice se denomina papila. Cada pirámide medular coronada por una región de corteza renal constituye un lóbulo sencillo (Vander, 1993).

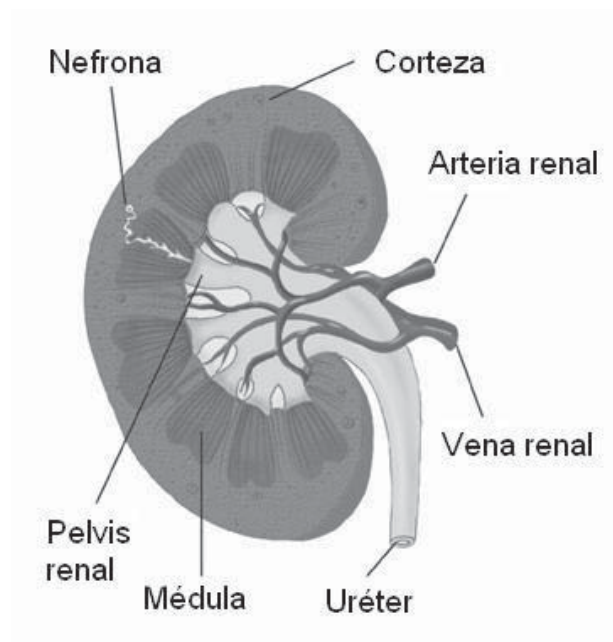


Figura 1. Corte longitudinal del riñón, se observan las estructuras principales del riñón: corteza, médula, arteria renal, vena renal, uréter y pelvis renal.

1.7.1. LA NEFRONA

El riñón humano está formado por cerca de un millón de nefronas, que son la unidad básica formadora de orina de los riñones. El riñón no puede regenerar nefronas nuevas, por lo tanto, las lesiones o las enfermedades renales, o el envejecimiento normal, producen una pérdida progresiva del número de nefronas. Sin embargo, esta pérdida no encierra peligro para la vida porque los cambios adaptativos de las restantes nefronas les permiten excretar las cantidades adecuadas de agua, electrolitos y productos de desecho.

Cada nefrona consiste en un glomérulo conectado a una porción tubular larga que reabsorbe y condiciona el ultrafiltrado glomerular. La nomenclatura para los segmentos de la porción tubular de la nefrona se ha tornado cada vez más compleja a medida que los fisiólogos renales han subdividido la nefrona en segmentos cada vez más cortos, la fundamentación descrita, en general, se realiza con base en la morfología de la cubierta de células epiteliales de los segmentos de la nefrona (Jackson, 2007).

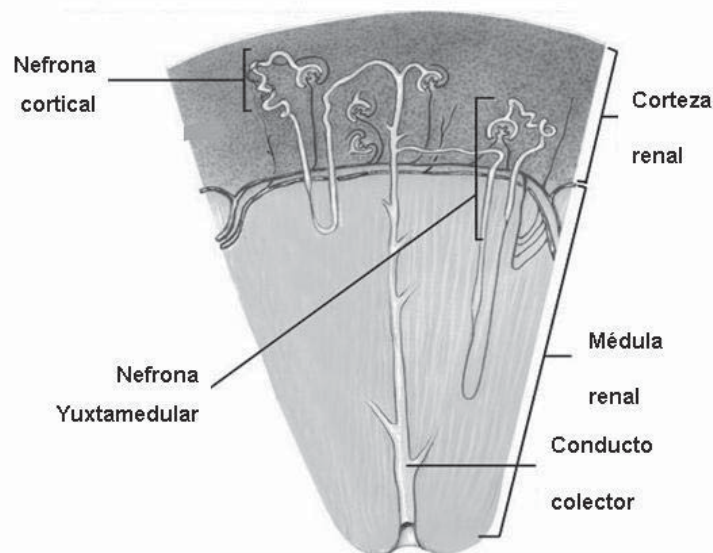


Figura 2. Esquema de las dos principales tipos de nefronas: cortical y yuxtamedular, ambas conectadas a los túbulos colectores de orina.

A pesar de que cada nefrona contiene todos los elementos descritos, existen diferencias regionales importantes en cuanto a la localización de los diferentes elementos tubulares y vasculares (Vander, 1993). Las nefronas que tienen sus glomérulos situados en la parte externa de la corteza, asas de Henle cortas, con un breve recorrido dentro de la médula, reciben el nombre de nefronas corticales. Otro tipo de nefronas, las yuxtamedulares que son alrededor del 20 al 30% de las nefronas, tienen sus glomérulos situados profundamente en la corteza renal, además sus asas de Henle penetran profundamente en la médula hasta alcanzar la punta de las papilas renales.

Los vasos que riegan las nefronas yuxtamedulares también se distinguen de los de las nefronas corticales. En estas últimas, todo el sistema tubular está rodeado de una extensa red de capilares llamados peritubulares. En cambio, en las nefronas yuxtamedulares, las largas arteriolas eferentes, se extienden desde los glomérulos hacia abajo penetrando en la parte externa de la médula y entonces se dividen en capilares especializados llamados vasos rectos, adosados al asa de Henle. Esta red especializada de capilares de la médula, desempeña un papel esencial en la formación de una orina concentrada y en la regulación de la homeostasis renal (Vander, 1993).

1.7.2. FORMACIÓN DE LA ORINA EN EL RIÑÓN

En el ser humano, los dos riñones producen en conjunto alrededor de 120 ml de ultrafiltrado y, no obstante, solo se forma 1 ml/min de orina. En consecuencia, más del 99% del ultrafiltrado glomerular se reabsorbe con gran costo de energía. Los riñones consumen 7% de la captación total de oxígeno

del cuerpo a pesar de que estos órganos sólo constituyen 0.5% del peso corporal (Jackson, 2007).

La formación de la orina es el resultado de tres procesos principales: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular. La formación de orina comienza con la filtración de una gran cantidad de líquido que prácticamente carece de proteínas, desde los capilares glomerulares a la cápsula de Bowman. La mayoría de las sustancias del plasma, excepto las proteínas, se filtran libremente, de tal modo que sus concentraciones en el filtrado glomerular de la cápsula de Bowman son casi las mismas que en el plasma. Cuando el líquido filtrado sale de la cápsula de Bowman y pasa por los túbulos, su composición se va modificando debido a la reabsorción de agua y de determinados solutos, que son devueltos a la sangre, ó debido a la secreción de otras sustancias que pasan desde los capilares peritubulares al interior de los túbulos. Cada sustancia del plasma tiene su propia combinación de filtración, reabsorción y secreción, antes de ser excretada. La tasa con la que una sustancia se excreta por la orina depende las tasas relativas de estos tres procesos renales básicos (Guyton y Hall, 2006).

1.7.3. REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL POR LOS RIÑONES

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre en contra de cualquier unidad de área de la pared del vaso sanguíneo y resulta de multiplicar el gasto cardiaco por las resistencias periféricas totales ($PA = GC \times RPT$), no obstante, esta relación matemática es extremadamente compleja al aplicarse a un sistema biológico, ya que están involucrados una serie de

mecanismos biológicos variados en su origen e interacción (Duarte et al., 2003).

Además de la formación de orina, los riñones tienen la función de regular la presión arterial a través de la activación de mecanismos humorales, como el sistema renina-angiotensina, que tiene una participación muy importante en la regulación de la presión arterial tanto a corto como a largo plazo (Jackson, 2007).

El mediador más importante de este sistema es el péptido angiotensina II (ANG II) y como agente vasoconstrictor es casi 40 veces más potente que la noradrenalina. Este péptido desempeña una participación importante en la homeostasis renal y cardiovascular, mediando sus efectos fisiológicos y fisiopatológicos a través de la estimulación de dos tipos de receptores específicos: AT₁ y AT₂, pero principalmente por el receptor AT₁.

El sistema renina angiotensina se activa cuando hay una disminución de la presión arterial por baja del volumen sanguíneo y/o de la concentración de sodio plasmático, principalmente. También lo activan la hipoperfusión de la corteza renal de cualquier etiología y la estimulación de los receptores adrenérgicos β_1 del aparato yuxtaglomerular (Cruz *et al.*, 2004).

La angiotensina II tiene diversas funciones tales como las siguientes:

a) INCREMENTA LA RESISTENCIA PERIFÉRICA TOTAL:

- a) Vasoconstricción directa,
- b) Aumento de la neurotransmisión noradrenérgica periférica,
- c) Aumento la actividad simpática, al estimular la liberación adrenalina de las glándulas suprarrenales.

b) REGULA LA FUNCIÓN RENAL:

a) Reduce la excreción urinaria de sodio y agua e incrementa la excreción de potasio,

b) Estimula la síntesis y secreción de aldosterona,

c) Reduce el flujo sanguíneo renal mediante la constricción directa del músculo liso vascular renal.

c) ALTERA LA ESTRUCTURA CARDIOVASCULAR:

Estimula la migración, proliferación, hipertrofia y/o la capacidad de síntesis de las células musculares lisas de los vasos, de los cardiomiocitos y/o de los fibroblastos.

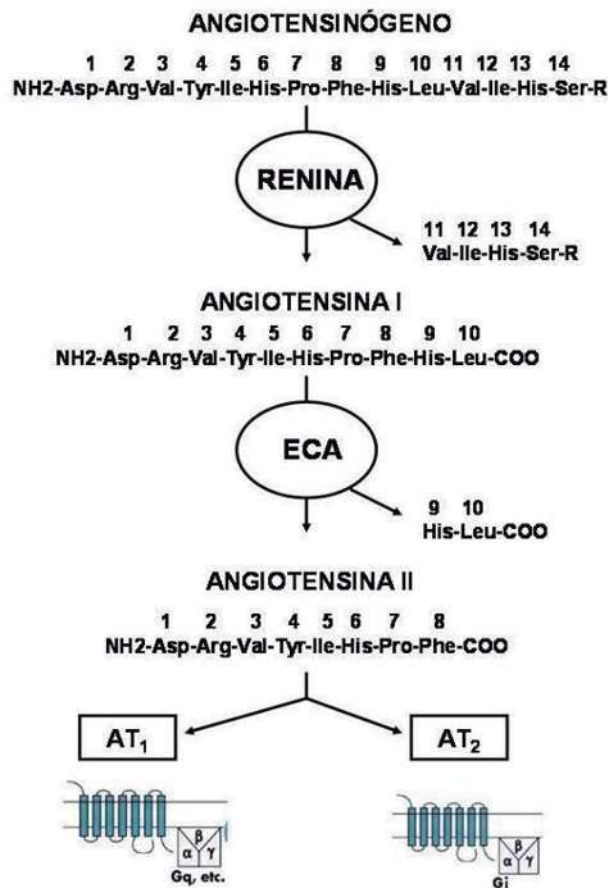


Figura 3. Vía clásica del sistema renina-angiotensina y formación de péptidos angiotensina. Las estructuras de las angiotensinas mostradas son las que se encuentran en seres humanos, caballos, ratas y cerdos. Se describe la secuencia N-terminal del angiotensinógeno humano. ECA, enzima convertidora de angiotensina; AT₁, receptor tipo 1 a la angiotensina II; AT₂, receptor tipo 2 a la angiotensina II.

1.7.4. SÍNTESIS DE ANGIOTENSINA II

En la figura 3 se muestra a la renina, que es sintetizada, almacenada y secretada hacia la circulación arterial renal por las células granulares del aparato yuxtaglomerular. Su secreción es controlada por dos vías intrarrenales y una extrarrenal. La vía intrarrenal de la mácula densa opera de acuerdo al flujo de NaCl. El aumento del flujo de este compuesto inhibe la liberación de renina y su disminución la estimula. La vía intrarrenal del baroreceptor funciona de acuerdo a los cambios de la presión sanguínea en los vasos preglomerulares, su aumento inhibe la liberación de renina y su baja la estimula. La vía extrarrenal del receptor β -adrenérgico es mediada por la liberación de noradrenalina desde las terminales nerviosas simpáticas postganglionares; la activación de los receptores adrenérgicos de las células yuxtaglomerulares aumenta la secreción de renina.

El angiotensinógeno es sintetizado principalmente por el hígado, aunque también en el riñón, en el tejido graso y en ciertas áreas del sistema nervioso central, la renina hidroliza el decapeptido del amino terminal del angiotensinógeno que la convierte en angiotensina I (ANG I).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), está ampliamente distribuida como una ectoenzima unida a la membrana de las células endoteliales de todo el sistema vascular. También se encuentra en cantidades menores en el plasma y en las células germinales de los testículos. Es una dipeptidil carboxipeptidasa que cataliza a la angiotensina I, convirtiéndola en angiotensina II (Cruz *et al.*, 2004) y degrada el nonapéptido bradicinina a fragmentos inactivos (Nour *et al.*, 2001).

Una vez sintetizada la ANGII, esta media sus efectos al estimular dos tipos de receptores de la membrana plasmática, heptahelicoidales acoplados a proteína G, AT₁ y AT₂ (Touyz *et al.*, 2000).

1.7.5. LOS RECEPTORES A LA ANGIOTENSINA II

a) EL RECEPTOR AT₁

El receptor AT₁ pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G y que típicamente activan a la fosfolipasa C a través de la proteína heterotrimérica G_{q/11} (Touyz *et al.*, 2000). En el humano el gen del receptor AT₁ se encuentra en el cromosoma 3, y en la rata los genes de los receptores AT_{1a} y AT_{1b} se encuentran en los cromosomas 17 y 2, respectivamente (Kim *et al.*, 2000). El receptor AT₁ consta de 359 aminoácidos, casi todos los efectos biológicos conocidos de la angiotensina II son mediados por este receptor, es decir, la estimulación de este receptor produce una elevación de la presión arterial, vasoconstricción, incremento en la contractilidad cardiaca, aumenta la liberación de aldosterona de las glándulas adrenales, facilita la liberación de catecolaminas de las terminales nerviosas, reabsorción de agua y sodio (Jackson, 2007). La distribución del receptor AT₁ es ubicua, encontrándose ampliamente en tejidos adultos, incluyendo vasos sanguíneos, corazón, riñón, glándulas adrenales, hígado, cerebro y pulmones (Kobori *et al.*, 2000).

Además, existen reportes que soportan la idea de que la angiotensina II, a través del AT₁, puede participar directamente en la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares y renales (Kim *et al.*, 2000).

b) EL RECEPTOR AT₂

La segunda isoforma principal de los receptores a la angiotensina II es el receptor AT₂ que está normalmente expresado en altas cantidades en tejidos fetales y disminuye rápidamente después del nacimiento (Touyz *et al.*, 2000). En el adulto, la expresión de este receptor es limitada, encontrándose principalmente en útero, ovarios, ciertos núcleos del cerebro, corazón y médula adrenal (Kim *et al.*, 2000). El receptor AT₂ consta de 363 aminoácidos; tiene poca homología en la secuencia de los aminoácidos (~32-34%) con el receptor AT₁; pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G. Aún no se definen bien las actividades funcionales de los receptores AT₂, pero es posible que ejerzan un papel fisiológico antagónico al AT₁, como efectos antiproliferativo, proapoptótico, vasodilatador y antihipertensivo (Matsubara, 1998).

1.8. PRESIÓN DE PERFUSIÓN RENAL

La vasculatura renal tiene dos importantes características. Primero, tiene dos principales sitios de control, las arteriolas aferentes y las arteriolas eferentes. Segundo, tiene dos redes de capilares en serie, llamados capilares glomerulares y peritubulares o vasos rectos.

Como consecuencia de esta única arquitectura, cuando ocurre una caída significativa de la presión en ambos tipos de arteriolas, la presión de los capilares glomerulares es relativamente alta, en tanto la presión de los capilares peritubulares es relativamente baja. La presión de perfusión renal está determinada por una selectiva constricción o relajación de las arteriolas aferentes y eferentes, lo cual permite un control altamente sensible de la

presión hidrostática mediante la capilaridad glomerular y por lo tanto de la filtración glomerular.

Comparado con la condición basal, en donde las resistencias arteriolas son las mismas, si se contrae la arteriola aferente, mientras la arteriola eferente se relaja, existe una disminución de la presión de capilar glomerular. Contrariamente, si se contrae la arteriola eferente, mientras se relaja la arteriola aferente, aumenta la presión de capilar glomerular. De estas respuestas idealizadas, uno puede deducir que un aumento en la resistencia arteriolar aferente puede disminuir la tasa de filtración glomerular (TFG) y un incremento en la resistencia arteriolar eferente puede tener el efecto opuesto. Sin embargo, cuando existen cambios fisiológicos en la resistencia arteriolar aferente y eferente usualmente no se mantiene una resistencia arteriolar total constante. De esta manera, cambios en la resistencia arteriolar renal, generalmente lleva a cambios en el flujo plasmático glomerular, que puede influenciar la TFG independiente de la presión de capilar glomerular (Giebisch *et al.*, 2005).

1.9. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LA DIABETES MELLITUS Y LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El SRA es uno de los sistemas implicados en regular la presión arterial controlando el volumen de fluido extracelular a través de las funciones vasoactivas de la angiotensina II y péptidos relacionados sobre células de músculo liso vascular (Prieto *et al.*, 2007).

El SRA, y en particular la molécula angiotensina II, tienen un rango de efectos hemodinámicos y no hemodinámicos. A la ANG II se le ha atribuido una contribución no solo al desarrollo de la hipertensión sino también a la

insuficiencia renal por una inapropiada activación de dicho sistema (Kobori *et al.*, 2007). Por consiguiente, durante mucho tiempo los IECA's y ARA's se han recomendado dentro de la primera línea de terapia tanto en personas con insuficiencia renal como en pacientes hipertensos debido a que reducen efectivamente la presión arterial (Kobori *et al.*, 2007).

La DM es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, aterosclerosis, e insuficiencia cardiaca congestiva. La tasa de mortalidad es mayor en diabéticos comparado con personas no diabéticas y las enfermedades cardiovasculares en pacientes diabéticos incrementan aún más el riesgo (Wichi *et al.*, 2007). El SRA se ha implicado en la etiología de las complicaciones cardiovasculares de la diabetes y la información publicada acerca del SRA en DM apunta hacia que este sistema tiene una participación muy importante en la fisiopatología de ésta. Lim y colaboradores (2004) encuentran que la hiperglucemia en ratas diabéticas lleva a un incremento en los niveles de RNAm y en la densidad del receptor AT₁ cardiaco sin alterar las concentraciones de renina plasmática.

Diversos estudios en modelos experimentales de diabetes muestran la relación del sistema renina angiotensina en esta enfermedad; por ejemplo, en ratas obesas (Otsuka Long-Evans Tokushima), que es un modelo de nefropatía con hipertensión, existe un incremento significativo en la angiotensina II intrarrenal. Mientras que en diabetes inducida con estreptozotocina incrementa tanto el contenido de proteína como de RNAm de la renina, así como el RNAm del angiotensinógeno intrarrenal (Kobori *et al.*, 2007).

En cultivos de células de túbulo proximal, las altas concentraciones de glucosa incrementan la expresión génica del angiotensinógeno, vía especies

reactivas de oxígeno, evidenciando que existe una activación del SRA intrarrenal en la DM (Zhang *et al.*, 2006).

La mayoría de las acciones de la angiotensina II sobre la función renal son consecuencia de la activación de sus receptores, que están ampliamente distribuidos en varias regiones y tipos celulares del riñón (Wichi *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2007). Por ejemplo, la deficiencia en los receptores AT_{1a} previenen la hipertensión inducida por diabetes (Wichi *et al.*, 2007).

La diabetes está asociada con la activación del SRA en humanos y en animales, y cambios en el SRA se han ligado a disfunción cardiovascular. Es bien aceptado que los antagonistas del SRA son el tratamiento de elección para el manejo de los diabéticos hipertensos. Estudios epidemiológicos muestran que el tratamiento con ARA's, losartán o cardesartán, disminuye la presión arterial y también reducen la incidencia de nuevos casos de diabetes. Así mismo, en animales, los ARA's, reducen la presión arterial en ratas diabéticas hipertensas. Baylis (2008) muestra que la diabetes se asocia con el incremento de la producción renal de angiotensina II. Un estudio reciente muestra que la diabetes inducida con estreptozotocina causa activación de la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA2), una enzima proteolítica involucrada en la formación del péptido vasodilatador ANG (1-7), como mecanismo compensatorio a esta enfermedad. También se ha reportado que la deficiencia de insulina inducida con estreptozotocina o resistencia a la insulina por una dieta alta en fructuosa activa el SRA, por una actividad de la ECA, niveles aumentados de ANG II y expresión en el cerebro de RNAm de AT_{1a}. (Wichi *et al.*, 2007).

En una diversidad de estudios experimentales, en modelos hipertensivos y no hipertensivos de nefropatía diabética, se han demostrado claramente efectos renoprotectores de agentes que reducen la actividad del SRA, tales como IECA's ó ARA's. En el estado diabético, estos agentes incrementan también la vía de la aldosterona y parecen ser particularmente útiles en el tratamiento de las enfermedades diabéticas renales y cardiovasculares.

La asociación entre el control de la glucemia y de la hipertensión se ha comprobado en diversos estudios clínicos (como el DCCT y el EDIC), en donde los pacientes reciben un régimen estricto de insulina y se previene la manifestación de nefropatía diabética en estos sujetos. Se ha reportado que la resistencia a la insulina directamente induce hipertensión. Singer y cols. (2007) reportaron que existe una correlación directa entre los niveles altos de insulina con la presión arterial, sin embargo, es incierto si la hipertensión por si misma pueda causar resistencia a la insulina (Ferrario, 2006). Existe una variedad de explicaciones para la asociación entre resistencia a la insulina y la hipertensión.

Primero, se ha sugerido que la angiotensina II está involucrada en el desarrollo de la resistencia a la insulina debido a los efectos directos de la ANG II sobre las vías de señalización de insulina. Segundo, se ha sugerido que la insulina puede alterar el manejo renal de sodio vía los efectos sobre la reabsorción tubular de sodio y la sensibilidad de sal (Sowers, 2007).

1.10. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA DIABETES E HIPERTENSIÓN

El óxido nítrico (ON) fue descrito por Furchgott y Zawadzki en 1980, quienes demostraron la capacidad de las células endoteliales para liberar un factor relajante potente, difusible, que causa vasorelajación en anillos aórticos

de conejo *in vitro*. El ON es un factor paracrino/autocrino, importante en la regulación fisiológica de numerosos procesos biológicos incluyendo neurotransmisión, control cardiovascular, crecimiento celular, apoptosis e inflamación (Mattson *et al.*, 2007).

El ON controla el tono vascular dependiente del endotelio y desempeña una función activa en numerosos procesos biológicos como la vasodilatación, la defensa contra infecciones o agresiones ambientales, la plasticidad de la sinapsis y ser una señal positiva en la activación del sistema inmunológico.

El ON se sintetiza en diversas células, además de las endoteliales, a partir del aminoácido L-arginina por cuatro isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés). Estas enzimas son citosólicas y las expresan genes diferentes, dos son dependientes de la Ca^{2+} /calmodulina, una es inducible por citocinas y otra se localiza en las mitocondrias. Dichas isoformas son: la endotelial (eNOS o NOS III), la inducible (iNOS o NOS II), la neuronal (nNOS o NOS I) y la mitocondrial (mNOS) (Ghafourifar *et al.*, 2007).

Estas enzimas catalizan la oxidación sucesiva de alguno de los dos residuos amino guanidino de la L-arginina para formar dos intermediarios inestables, la N^G -hidroxi-L-arginina y posteriormente la N^G -oxo-L-arginina de mayor estado de oxidación. De esta última se libera óxido nítrico y L-citrulina, por un reacomodo intramolecular (Moncada *et al.*, 1989).

a) DEFICIENCIA DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA DIABETES MELLITUS Y EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El endotelio es la capa interna biológicamente activa de los vasos sanguíneos (Schalkwijk *et al.*, 2005), desempeña una participación clave en la

modulación del tono vascular, a través de la producción y liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Taddei *et al.*, 1998). Entre las moléculas importantes sintetizadas por las células endoteliales está el óxido nítrico que es importante por sus propiedades vasodilatadoras, antiplaquetarias, antiproliferativas, disminuye la permeabilidad vascular y antiinflamatorias (Schalkwijk *et al.*, 2005).

En la hipertensión humana, las pruebas disponibles indican que existe reducción de la producción basal de óxido nítrico y una respuesta disminuida a la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por agonistas, como acetilcolina, metacolina, bradicinina o la sustancia P en la vasculatura del antebrazo. Esta respuesta anómala a los agonistas puede ser causada por la presencia simultánea de una alteración en la vía L-arginina-óxido nítrico y/o la producción de sustancias vasoconstrictoras derivadas de la ciclooxigenasa.

La reducción de la producción basal de ON parece ser secundaria al incremento de la presión arterial, mientras que, a diferencia de las observaciones en animales, es posible que el deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio y provocada por agonista pueda ser un fenómeno primario, puesto que puede detectarse en los sujetos normotensos sanos con padres hipertensos esenciales (Mattson, 2007).

Además de lo mencionado anteriormente, el envejecimiento puede inducir también deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio por mecanismos similares a los observados en la hipertensión esencial. Es interesante observar que las mujeres, tanto normotensas como hipertensas, parecen estar protegidas de la disfunción endotelial relacionada con la edad hasta el comienzo de la menopausia (Prieto *et al.*, 2007).

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que en etapas tempranas de diabetes experimental existe una mayor liberación de ON en las arterias grandes como la aorta, mientras que en periodos largos de exposición a esta patología, la liberación de este factor relajante es nula, asemejando la remoción endotelial de ratas control.

b) EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL RIÑÓN

Las NOS se expresan ampliamente a lo largo de la vasculatura renal y la nefrona. Las cuatro isoformas principales están presentes en un número de segmentos vasculares y tubulares diferentes. La participación del ON en el control de la función renal se ha estudiado extensamente (Ishii *et al.*, 2001). A la fecha, hay estudios que indican que bajo condiciones fisiológicas el ON regula las resistencias vasculares renales, participa en el control de la hemodinámica renal y glomerular, activa el circuito de retroalimentación tubuloglomerular, aumenta la liberación de renina y transmisores simpáticos, regula el transporte tubular de iones y excreción renal de agua y sodio (Mattson *et al.*, 2007). De esta manera el ON intrarrenal contribuye a la regulación a largo plazo de la presión arterial (Mattson *et al.*, 2007).

Las acciones autocrina/parácrina del ON en el riñón se han estudiado en los vasos rectos de la médula renal, en donde se ha observado una comunicación cruzada llamada túbulo-vascular. Bajo condiciones normales, estos estudios demuestran que la angiotensina II incrementa la liberación de ON intracelular (Mattson *et al.*, 2007), favoreciendo de esta manera la reabsorción de líquidos y solutos y la formación de una orina más concentrada.

Es ampliamente aceptado que el ON es un importante factor antihipertensivo endógeno que desempeña una participación significativa en el control de fluidos, la homeostasis de electrolitos y la regulación de la presión arterial. Una disfunción en las NOS en muchos tejidos se ha observado en ratas genéticamente hipertensas o también en ratas Dahl sensibles a sal. Además, la delección génica de la eNOS se asocia con el desarrollo de hipertensión en ratones. A pesar de los datos substanciales que demuestran la importancia del ON en el desarrollo de la hipertensión, el mecanismo del efecto antihipertensivo mediado por óxido nítrico está sujeto a debate.

1.11. HIPERTENSIÓN POR DEFICIENCIA DE ÓXIDO NÍTRICO

La hipertensión arterial representa un grave problema de salud pública y a pesar de que existe un gran número de publicaciones relacionadas con el tema, la etiología de la misma sigue siendo desconocida. Hay una diversidad de modelos experimentales de hipertensión que se han empleado para el escrutinio de esta patología. Existen modelos de hipertensión primaria como ratas espontáneamente hipertensas (SHR); modelos de hipertensión secundaria como ratas sensibles a la dieta de sal (DOCA), hipertensión renovascular (one, two-clip one kidney), hipertensión por infusión de angiotensina II (bomba osmótica), hipertensión por inhibición de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME) y la característica común de todos ellos es que existe un desequilibrio en las sustancias vasoactivas como es el óxido nítrico (ON), por lo que resulta importante estudiar los mecanismos fisiopatológicos de este último tipo de hipertensión mencionado.

La administración a largo plazo de inhibidores de las NOS por administración oral ó intravenosa ha demostrado producir una hipertensión sostenida y reversible en diferentes especies como ratón, rata, conejos y perros. Las características comunes entre las diferentes especies con este modelo son: hipertensión sistémica, vasoconstricción renal, una reducción en la coeficiente de ultrafiltración capilar glomerular (K_f glomerular) y retención de sodio (Mattson *et al.*, 2007).

Aunque la administración crónica oral ó intravenosa de inhibidores de las NOS produce hipertensión, no está claro si la hipertensión observada es el resultado de la vasoconstricción sistémica generalizada, un efecto de la reducción de ON en el cerebro, ó una consecuencia primaria de la reducción de la función excretoria renal.

En el riñón los mecanismos potenciales por los que la inhibición ó deficiencia de las NOS pueden producir hipertensión son: la reducción de los niveles de ON en el riñón entero, que provocan una disminución de la velocidad de filtración glomerular a través de aumentar la constricción de la vasculatura renal, también se modifica la filtración túbulo-glomerular en respuesta y/o reducción del coeficiente de ultrafiltración glomerular, disminuyendo así la carga de filtración. Además, una reducción de los niveles de ON renal lleva a una disminución en el flujo sanguíneo medular renal e incrementa la actividad tubular del intercambiador Na^+/H^+ , $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ y los canales de sodio sensibles a amilorida. Conjuntamente, estos efectos podrían llevar a un incremento en la reabsorción tubular de sodio que podría atenuar la presión de natriuresis y diuresis y resultar en una retención de sodio e hipertensión (Mattson *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Los factores de riesgo para sufrir enfermedades cardiovasculares entre los que se incluye la insuficiencia renal, están asociadas con complicaciones que llegan a ser un grave problema de salud pública de magnitud considerable en naciones industrializadas y actualmente en México, ocupan el primer lugar de morbilidad y mortalidad.

Tanto la Diabetes Mellitus como la hipertensión arterial producen un daño marcado a órganos importantes en la regulación de la presión arterial como el riñón y los mecanismos que subyacen a esta anomalía no se han esclarecido.

La información publicada apunta a que el sistema renina angiotensina es un factor importante en la fisiopatología de ambas enfermedades.

Se desconoce como participa el receptor a la angiotensina II, AT₁, en el riñón en ambos padecimientos. Por lo anterior es de nuestro interés estudiar los mecanismos que condicionan estas alteraciones, para el mejor entendimiento de la fisiopatología.

3. HIPÓTESIS

Durante la Diabetes Mellitus y la hipertensión arterial existe un aumento en la respuesta presora a la angiotensina II en el riñón, mediado por el receptor AT₁.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la influencia del receptor AT₁ sobre la respuesta presora a la angiotensina II en el riñón durante la Diabetes Mellitus y la hipertensión arterial.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1. Determinar y evaluar los cambios en la respuesta presora a la angiotensina II en el riñón de ratas diabéticas-hipertensas

4.2.2. Evaluar la participación del receptor AT₁ en la respuesta presora renal de ratas diabéticas-hipertensas

4.2.3. Determinar los niveles de los receptores AT₁ en el riñón de ratas diabéticas-hipertensas.

CAPÍTULO II

5. METODOLOGÍA

5.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200 a 250 g de peso y se dividieron en 4 grupos: Control, Diabetes, hipertensión y Diabetes-hipertensión. Todos los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética Institucional y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, México). Durante el tratamiento, a los animales de todos los grupos se les midió la ingesta de agua y el peso corporal para ajustar la dosis de los fármacos administrados. También se midió la concentración de glucosa en sangre, con ayuda de un glucómetro y tiras reactivas, antes de la inducción de la Diabetes, a las 48 horas post-inducción y una última medición al día 15 de tratamiento. La presión arterial se tomó en la arteria caudal de la rata con un método no invasivo (pletismógrafo LE 5007, Letica, PanLab, Barcelona España); se registró una medición basal al día cero, una a los ocho días de tratamiento y una última medición antes del sacrificio del animal.

5.2. DESARROLLO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

5.2.1. INDUCCIÓN DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HA)

Para la inducción de la hipertensión secundaria se administró una dosis de 75 mg/Kg/día del fármaco L-NAME (clorhidrato de N_ω-Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro; un inhibidor no selectivo de las NOS; Sigma, S.A) (Zatz *et al.*, 1998) disuelto en el agua de beber, al grupo control se le administró

solamente agua *ad libitum*. Las ratas con presión arterial $\geq 140/90$ mmHg se consideraron como hipertensas, mediante el método platismográfico.

5.2.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS (DM)

Para la inducción de la Diabetes experimental, se inyectó vía intraperitoneal una dosis única de estreptozotocina 60 mg/kg (un agente citotóxico de las células β del páncreas; Sigma, S.A) (Ward *et al.*, 2001), disuelto en buffer de citratos (ácido cítrico y citrato sódico) y el grupo control recibió solamente el vehículo, en el mismo volumen. 48 horas después (día cero) y antes del sacrificio del animal (día 15), se midió la concentración de glucosa en sangre. Sólo las ratas con glucosa sanguínea >200 mg/dl se consideraron como diabéticas.

5.2.3. INDUCCIÓN DE LA DIABETES-HIPERTENSIÓN (DM-HA)

Para desarrollar el modelo de Diabetes e hipertensión en la rata Wistar, primero se inyectó estreptozotocina de la misma manera que el grupo diabético, 48 horas después (día cero) se midió la concentración de glucosa en sangre y si los animales cumplieron el criterio para considerarse diabéticas se inició el tratamiento hipertensivo, con L-NAME, en las mismas condiciones que el grupo hipertenso. Solo las ratas que cumplieron el criterio de diabéticas-hipertensas, fueron usadas para los experimentos posteriores.

5.3. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las ratas se sometieron a anestesia profunda con pentobarbital sódico (50mg/Kg), después se procedió a aislar y disecar el riñón derecho de los animales de todos los grupos experimentales, utilizando la metodología de

riñón aislado y perfundido y un sistema de adquisición de datos (Biopac System Inc., CA, USA) para construir curvas concentración-respuesta.

Primeramente, se realizó una laparotomía, incidiendo plano por plano hasta llegar al peritoneo y exponer el riñón derecho, éste se descapsuló para eliminar las glándulas suprarrenales y el posible efecto de las hormonas liberadas por ellas. En el riñón derecho de los animales de todos los grupos experimentales; control, diabéticas, hipertensas, y diabéticas-hipertensas se realizaron curvas concentración-respuesta a la angiotensina II (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) para registrar la presión de perfusión dependiente de la concentración en el tejido estudiado. Una segunda curva concentración-respuesta a la angiotensina II fue realizada en las mismas condiciones que la primera curva y en presencia de losartán (3.16×10^{-9} M), un antagonista selectivo del receptor AT_1 .

Después de las curvas concentración-respuesta, los mismos riñones se pesaron para obtener el coeficiente de masa renal y posteriormente, se dividieron en corteza y médula renales para la determinación de los niveles del receptor AT_1 por la técnica de Western Blot.

5.4. REACTIVOS

Los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich: angiotensina II, losartán, fenilefrina, sales de la solución Krebs-Henseleit (NaCl, KCl, CaCl, $MgSO_4$, KH_2PO_4 , $NaHCO_3$, EDTA, Glucosa). Todos los reactivos se disolvieron en agua destilada. La estreptozotocina este se disolvió en buffer de citratos.

5.5. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II

Los riñones derechos aislados se canularon a través de la arteria mesentérica superior hasta llegar a la arteria renal. Una vez aislado el riñón, a través de la cánula se conectó a un flujo constante de solución Krebs-Henseleit

a 10 ml/min, con la siguiente composición (en mM); NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl, 2.52; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.75; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.027 y Glucosa 11.6; con un pH de 7.4; 37° C y burbujeo constante de carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) y se montó en un sistema de órgano aislado y perfundido tipo Langendorff.

Por el extremo de la cánula, cada riñón se conectó a un serpentín de calentamiento acoplado a un transductor de tensión (FT03 Grass force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Wawick, RI USA), acoplado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac systems Inc. Santa Bárbara CA, EUA) y registraron los cambios en la presión de perfusión renal.

Una vez montados los riñones se hizo una sensibilización del tejido, en 2 ocasiones a intervalos de 20 minutos, con 10µl en bolo de una concentración submáxima de fenilefrina ($1 \times 10^{-4} \text{M}$). Lo anterior permitió que el riñón se estabilizara en respuesta al estímulo exógeno además de determinar si el órgano era viable para la respuesta funcional a la angiotensina II.

Posterior a la sensibilización del tejido, se realizó la primera curva concentración-respuesta administrando 10µl de angiotensina II, en el rango de concentraciones de 1×10^{-9} a 1×10^{-5} M, seguido de la recuperación del tejido por 1 hora. 30 minutos antes de la segunda curva se incubó con el antagonista losartán ($3.16 \times 10^{-9} \text{M}$) disuelto en la solución Krebs-Henseleit, finalmente, se corrió una segunda curva a la angiotensina II (1×10^{-9} - $1 \times 10^{-5} \text{M}$). El propósito de esta curva fue observar la participación del receptor AT₁ en la presión de perfusión renal.

5.6. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DEL RECEPTOR AT₁ EN CORTEZA Y MÉDULA RENALES

a) Homogenización

El riñón se dividió en corteza y médula para posteriormente hacer un homogenado de 50mg de tejido, aproximadamente, con 1ml de solución RIPA [TRIS-HCL pH 7.4, NaCl 5 M, MINICOMPLETE (Mezcla de Inhibidores de proteasas), TRITON X100 y SDS 20%] y la ayuda de un politrón (kinematica AG Littau; Switzerland). Posteriormente, se realizó una centrifugación a 10 000 rpm por 10 min a 4° C para separar las proteínas totales del sobrenadante.

b) Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovina (BSA). Para ello se emplearon volúmenes correspondientes a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 µg de proteína, se agregaron los reactivos de Lowry y se incubó a temperatura ambiente, 30 min, para después tomar la lectura de absorbencia a 750nm (Espectrofotómetro Ultrospec™ 3300 pro, Amersham Biosciences uv/visible). Las muestras de corteza y médula se sometieron al mismo tratamiento. La curva de calibración se hizo en Excel (Microsoft Office) y por extrapolación se estimó la concentración de proteínas en las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

c) Electroforesis

Se agregó 10% de buffer de carga Laemlli (0.125 M Tris HCl pH 6.8, SDS 0.35 M, Glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.03

mM). Las muestras se hirvieron, 10 minutos, a 100° C, para desnaturalizar a las proteínas.

Se prepararon geles SDS-PAGE al 10%, cargando 50 µg de proteína, de cada una de las muestras en pozos diferentes, en el pozo número 1 se cargaron 3 µl de marcador de peso molecular (AMRESCO® protein marker Wide range). La electroforesis se llevó a cabo, durante 2 horas a 88 V, por medio de la aplicación de un campo eléctrico para separar las proteínas en función de su masa molecular.

d) Transferencia de la proteína a una membrana de Fluoruro de Polivinil Dieno (PVDF)

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a la membrana de PVDF (fluoruro de polivinildieno; Amersham Biosciences), utilizando buffer de transferencia (Trizma Base, Glicina, Metanol 10%, SDS 10%). La electrotransferencia se hizo en condición semiseca empleando un TRANS-BLOT (Bio-Rad), durante 45 minutos a 18 V.

Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron incubadas durante 2 horas, con agitación constante en TBS-tween leche baja en grasas para el bloqueo de los sitios inespecíficos (Tris 20mM, NaCl 137mM, tween 20, 0.05% y leche 5%), a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra, dirigido contra el carboxilo terminal del receptor AT₁ o contra β-actina (de peso molecular aproximado de 40 y 45 kDa, respectivamente; Santa cruz Biotechnology) ambos a una dilución 1:1000, en TBST-5% leche a 4° C durante toda la noche y con agitación constante.

Luego la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween, para después incubar por 2 horas con el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-cabra Anti IgG (Acoplado a la enzima peroxidasa; Zymed®) en TBS-tween leche, a la dilución 1:10000, en agitación constante durante 2 horas, a temperatura ambiente. Pasando este tiempo la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween, en agitación constante a temperatura ambiente durante 10 minutos por lavado.

La determinación del receptor AT₁ y de la β -actina se realizó en la misma membrana y para evitar la detección cruzada, se eliminaron los anticuerpos de la primera detección con agitación constante de la membrana en una solución de NaOH 0.2M, durante 5 minutos (rasurado).

e) Reacción Quimioluminiscente

El revelado se realizó incubando la membrana, utilizando luminol, un sustrato de fluorescencia (Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante en un casete de radiografía, se sobrepuso la membrana de PVDF, posteriormente se expuso a una placa fotográfica para captar la luz emitida por la reacción y el tiempo de exposición dependió de la intensidad de la banda, posteriormente la placa fotográfica se sometió a un revelado.

Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner (Fujifilm FLA-5100 imaging system). La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (Fujifilm Multi-Gauge Software) y se normalizaron con la densidad de la β -actina (proteína de control interno).

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar utilizando el programa Sigma Plot 8.02 para la construcción de las gráficas. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías comparando todos los grupos en el programa Sigma Stat 3.0 (Advisory Statistical Software). El efecto máximo (E_{max}) y la concentración efectiva 50 (CE_{50}) se calcularon empleando regresiones no lineales con parámetros farmacodinámicos empleando el programa WinNonlinTM professional version 2.1. Para los promedios de los resultados de peso corporal, ingesta de agua, glucosa sanguínea, presión arterial, coeficiente de masa renal, presión basal de perfusión, contracción con solución Krebs-Henseleit 80mM, por tratarse de variables con distribución normal y ser de tipo continuo se utilizó ANOVA de una vía. En todos los casos se tomó como nivel de significancia estadística una $p < 0.05$.

CAPÍTULO III

6. RESULTADOS

6.1. PESO CORPORAL:

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200-250 g, las cuales se pesaron antes del inicio del tratamiento, a los 8 y a los 15 días para ajustar la dosis de los fármacos administrados respecto al peso. En las ratas control, se observó un comportamiento normal, un aumento de peso conforme avanzó la edad de las ratas, en el grupo de hipertensión se observó una tendencia a subir de peso similar al grupo control. En tanto los grupos diabético y diabético-hipertenso mostraron un comportamiento diferente; a los 8 días se mantuvieron en su peso inicial, mientras que el grupo diabético a los 15 días presentó una tendencia a aumentar de peso, pero este no llegó a los valores del grupo control. El grupo diabético-hipertenso se mantuvo en el mismo peso desde el inicio hasta el final del tratamiento. Esta gráfica muestra que nuestros datos concuerdan con lo reportado anteriormente, en que la hipertensión no provoca una pérdida del peso y la diabetes produce una disminución progresiva del peso corporal.

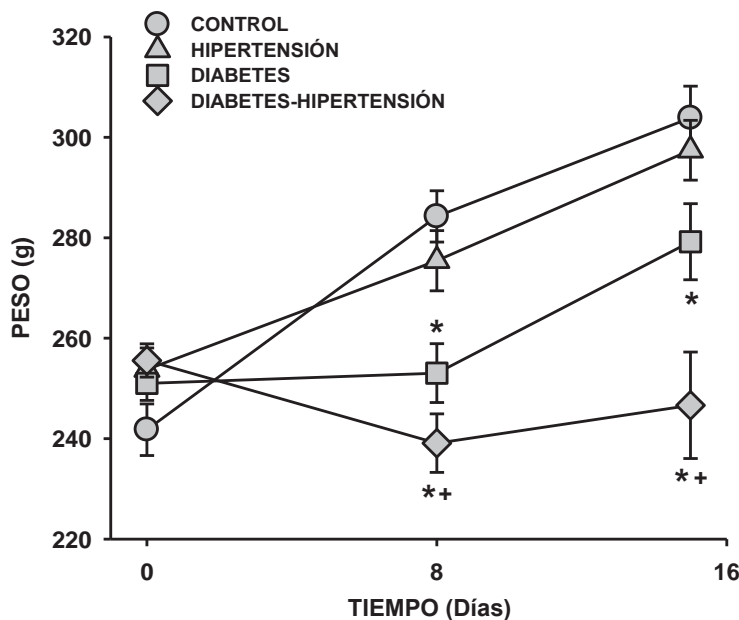


Figura 4. Curso temporal del peso corporal de los animales control, hipertensos, diabéticos, y diabéticos-hipertensos. Los valores son el promedio \pm el error estándar de 4-6 animales.

* $p < 0.05$ Vs. Control, $^+ p < 0.05$ Vs. Hipertensión

6.2. INGESTA DE AGUA:

La ingesta de agua se midió diariamente para calcular la dosis de L-NAME, fármaco disuelto en el agua de beber, respecto a la cantidad de agua ingerida. Para el grupo control, el consumo de agua fue de aproximadamente 40 ml y se mantuvo en los mismos valores a lo largo del tratamiento, en el grupo hipertenso, al igual que el grupo control, no se modificó la ingesta de agua a lo largo del tratamiento. El grupo diabético mostró un aumento en la ingesta de agua a partir de las 48 horas post-inducción de la Diabetes llegando a consumir 120ml de agua al día, aproximadamente. De manera similar, el grupo diabético-hipertenso aumentó la ingesta de agua a partir de las 48 horas post-inducción de la Diabetes, aunque no se comportó igual que el grupo diabético y este consumo fue de 100 ml aproximadamente. Estos datos concuerdan con la polidipsia presentada en la diabetes, sugiriendo que el modelo experimental de diabetes se desarrolla de manera adecuada.

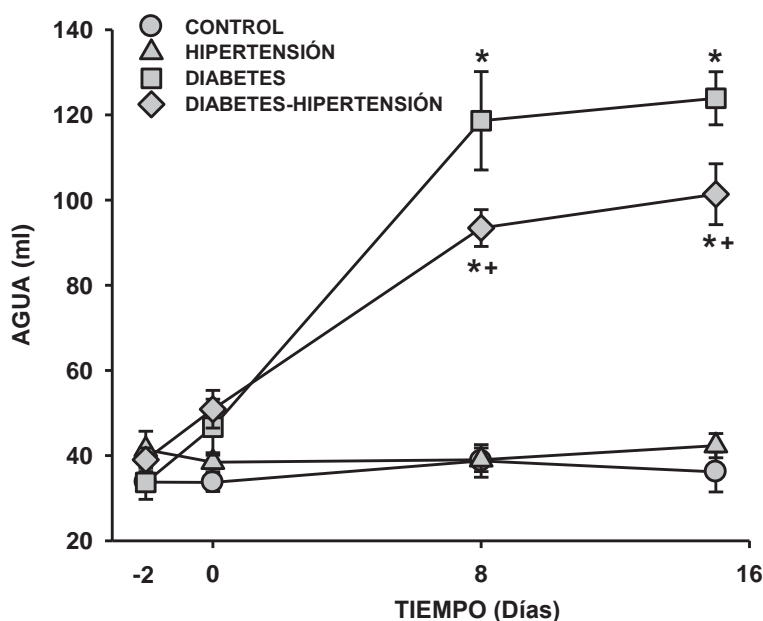


Figura 5. Curso temporal de la ingesta de agua de los animales control, hipertensos, diabéticos, y diabéticos-hipertensos. Los valores son el promedio \pm el error estándar de 4-6 mediciones. * $p < 0.05$ Vs. Control, $^+ p < 0.05$ Vs. Hipertensión

6.3. GLUCOSA SANGUÍNEA:

Se determinó la concentración de glucosa sanguínea con ayuda de un glucómetro y tiras reactivas antes de la inducción de la Diabetes, antes del inicio del tratamiento hipertensivo con L-NAME y una última medición antes del sacrificio del animal. Las ratas control presentaron valores normales de glucosa sanguínea y mantuvieron valores de glucosa de 100mg/dl a lo largo del tratamiento, el grupo hipertenso se comportó de manera similar al grupo control y su glucosa sanguínea no se modificó durante los 15 días de tratamiento. Los grupos diabético y diabético-hipertenso mostraron un aumento significativo de la glucosa sanguínea a partir de las 48 horas post-inducción de la Diabetes llegando a valores de 400mg/dl, aproximadamente y estos valores se mantuvieron hasta el sacrificio de los animales. Esta gráfica concuerda con lo reportado anteriormente, en que la diabetes produce hiperglucemia, sugiriendo que nuestras condiciones de inducción de la diabetes es adecuada.

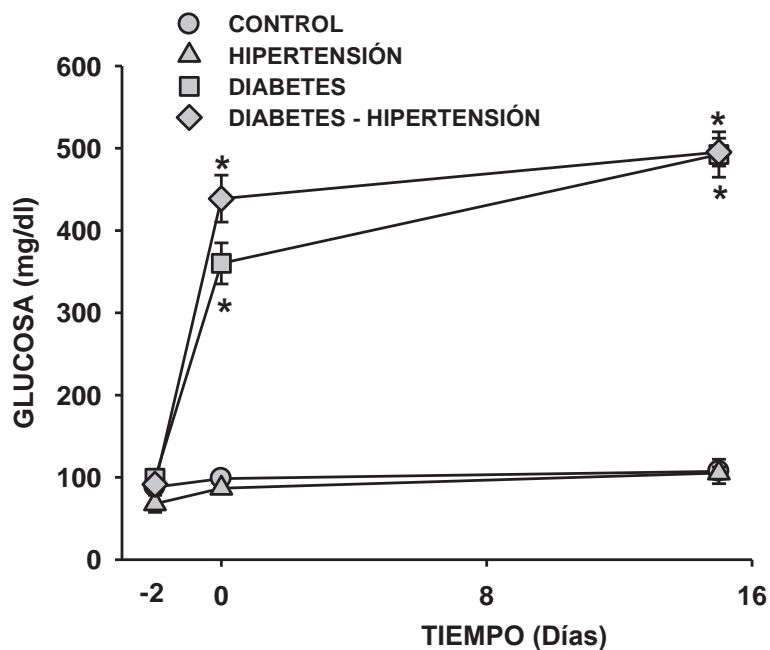


Figura 6. Curso temporal de la glucosa sanguínea de los animales control, hipertensos, diabéticos, y diabéticos-hipertensos. Los valores son el promedio \pm el error estándar de 4-6 animales. * $p < 0.05$ Vs. Control, ⁺ $p < 0.05$ Vs. Hipertensión

6.4. PRESIÓN ARTERIAL:

A los animales de los diferentes grupos experimentales, se les midió la presión arterial con ayuda de un pletismógrafo (método no invasivo) en la arteria caudal de la cola de la rata antes del inicio del tratamiento hipertensivo, a los 8 y a los 15 días de tratamiento. Para una medición más confiable, los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y un ambiente sin estrés.

Las ratas control presentaron valores normales de presión arterial y estos se mantuvieron a lo largo de los 15 días (120/80 mmHg). En tanto la Diabetes no fue capaz de modificar la presión arterial de las ratas, manteniendo valores de normotensión. En tanto, los grupos que recibieron el tratamiento con L-NAME, es decir, el grupo hipertenso y diabético-hipertenso, a partir de los 8 días de tratamiento presentaron un incremento en la presión arterial (35/32 mmHg) y este incremento se mantuvo hasta el día del sacrificio del animal.

Estos datos muestran que la dosis administrada de L-NAME es la adecuada para producir una hipertensión sostenida en la rata Wistar, siendo un modelo adecuado para el estudio de esta patología.

Tabla 4. Registro de la presión arterial (Sistólica/Diastólica mmHg) de los diferentes grupos experimentales tratados con L-NAME (75mg/Kg/día). Los valores son el promedio \pm el error estándar de 4-6 animales.

GRUPO	BASAL (mmHg)		8 DÍAS (mmHg)		15 DÍAS (mmHg)	
	Sistólica	Diastólica	Sistólica	Diastólica	Sistólica	Diastólica
CONTROL	108 \pm 4	90 \pm 5	113 \pm 3	93 \pm 3	110 \pm 4	91 \pm 4
HIPERTENSIÓN	108 \pm 4	87 \pm 5	143 \pm 5 *	119 \pm 5 *	149 \pm 6 *	127 \pm 6 *
DIABETES	112 \pm 3	93 \pm 3	113 \pm 2	89 \pm 3	118 \pm 3	93 \pm 2
DIABETES- HIPERTENSIÓN	111 \pm 2	92 \pm 3	143 \pm 2 **	122 \pm 3 **	143 \pm 3 **	121 \pm 3 **

* $p < 0.05$ Vs. Control, $^+p < 0.05$ Vs. Diabetes

6.5. COEFICIENTE DE MASA RENAL:

El porcentaje de coeficiente de hipertrofia renal es un valor que se obtiene dividiendo el peso húmedo del riñón aislado entre el peso corporal de la rata (Jensen *et al.*, 1981). El grupo control mostró un valor de 0.4 y el grupo hipertenso no fue diferente del control. Los grupos diabéticos mostraron un aumento respecto al control y resultó interesante que el grupo diabético-hipertenso presentó un coeficiente de masa que se ve potenciado por ambas enfermedades. Esta gráfica hace evidencia y concuerda con reportes previos en que la diabetes produce daño marcado al riñón y dicho daño se potencia cuando están asociadas ambas enfermedades.

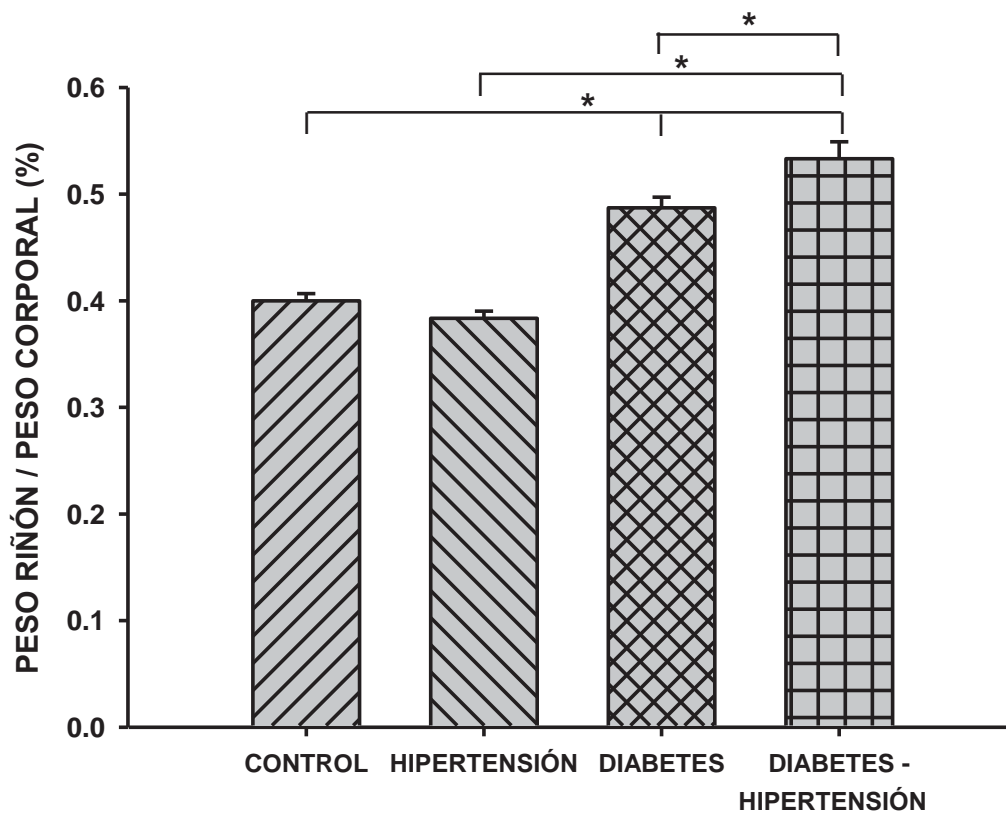


Figura 7. Coeficiente de masa renal de animales Control, hipertensión, Diabetes y Diabetes-hipertensión. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 4-6 experimentos. * $p < 0.05$ Vs. Control.

6.6. PRESIÓN BASAL DE PERFUSIÓN:

El valor de presión de perfusión se obtiene en condiciones basales, es decir, cuando el riñón no está bajo algún estímulo y ha alcanzado el equilibrio, este valor indica la presión en que inicia la curva concentración-respuesta a la angiotensina II. El grupo control inició en valores de 120 mmHg, el grupo hipertenso en 160 mmHg, el grupo diabético en 100 mmHg y el grupo diabético-hipertenso en 140 mmHg, aproximadamente. Es evidente que los grupos que están tratados con L-NAME presentaron una presión basal mayor que el grupo control, mientras los que no fueron tratados con este fármaco mantuvieron valores normales de presión. Con estos datos se puede sugerir que la inhibición crónica de óxido nítrico parece ser la responsable de este comportamiento.

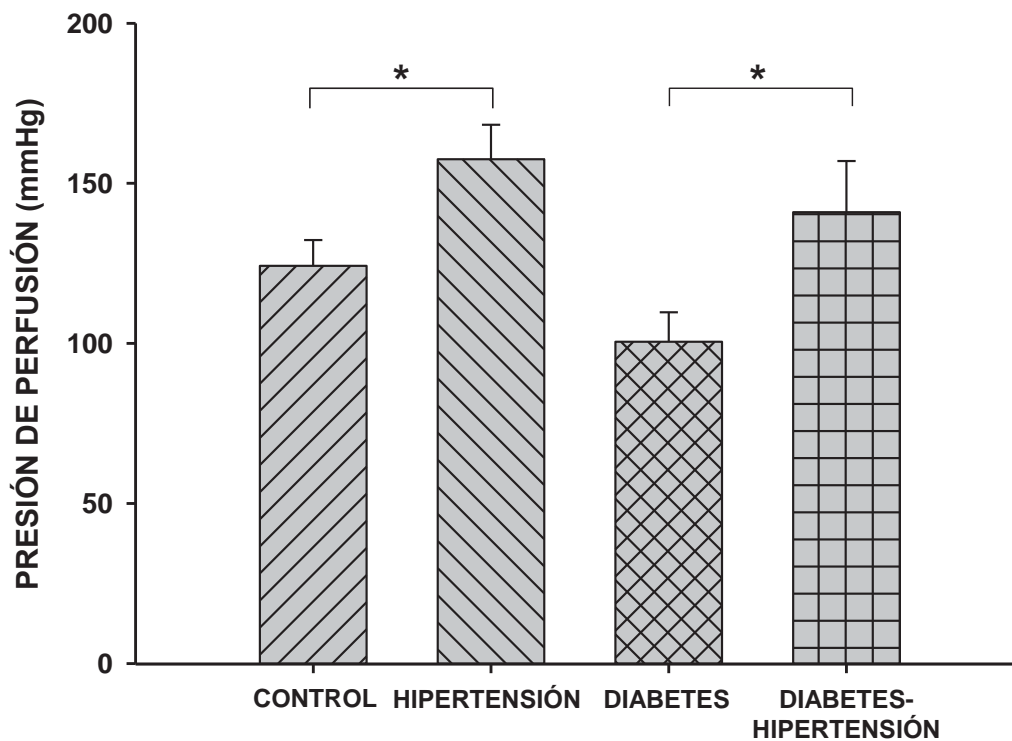


Figura 8. Presión basal de perfusión de riñones de animales Control, hipertensión, Diabetes y Diabetes-hipertensión. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 4-6 experimentos. * $p < 0.05$ Vs. Control.

6.7. CONTRACCIÓN CON K⁺ EN SOLUCIÓN KREBS-HENSELEIT 80 mM:

Debido a que la presión basal de perfusión no es uniforme en todos los grupos, se hizo una contracción de la vasculatura renal con K⁺ en solución Krebs-Henseleit 80mM (Félétou *et al.*, 1994); además, este valor sirve para observar si existe daño a la maquinaria contráctil de la célula. Todos los grupos presentaron un incremento de la presión de perfusión de 160 mmHg, aproximadamente. Este valor permitirá una normalización de la respuesta presora a la angiotensina II, además sugiere que los posibles cambios a observar no se deben a un daño en la maquinaria contráctil de la célula.

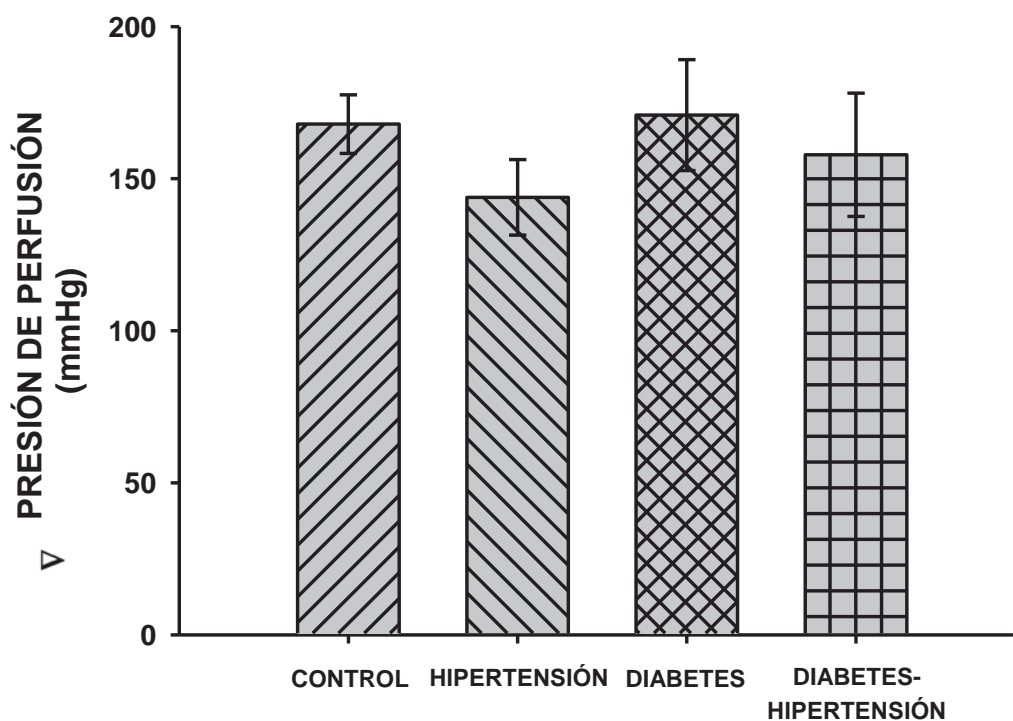


Figura 9. Incremento en la presión de perfusión con K⁺ en solución Krebs-Henseleit 80 mM. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 4-6 experimentos.

6.8. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II:

En el riñón aislado de las ratas de cada grupo se montó en una preparación de órgano aislado y perfundido, tipo Langendorff, posteriormente se construyeron curvas concentración-respuesta a la angiotensina II (Figura 10). Se observó que la angiotensina II produjo un aumento de la presión de perfusión renal dependiente de la concentración de la angiotensina II, en todos los grupos de ratas, hasta llegar a un efecto máximo (E_{max}). Se observó que existe un desplazamiento de la curva a la izquierda del grupo hipertenso, aunque este desplazamiento no es significativo estadísticamente, respecto al grupo control (Tabla 5).

La curva del grupo diabético se desplazó aún más a la izquierda que el grupo hipertenso y el grupo control, sin embargo este desplazamiento no es estadísticamente significativo, en cuanto al efecto máximo es mayor respecto al grupo control (Tabla 5). El grupo diabético-hipertenso resultó ser el más sensible a la angiotensina II, debido a que existe un desplazamiento muy notorio de la curva a la izquierda respecto al control, modificándose tanto la sensibilidad como el efecto máximo. Los datos mostrados en la tabla 5 y figura 10 sugieren que existe hipersensibilidad a la ANGI, posiblemente a un aumento en el número de receptores.

Tabla 5. Valores de sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}). Se representa el promedio \pm el error estándar de 5-7 experimentos.

GRUPO	CONTROL		LOSARTÁN ($3.2 \times 10^{-8} M$)	
	E_{max} (mmHg)	pD_2	E_{max} (mmHg)	pD_2
CONTROL	54.8 ± 3.8	6.02 ± 0.3	41.6 ± 5	5.59 ± 0.28
HIPERTENSIÓN	54.9 ± 5.7	6.5 ± 0.25	57.9 ± 3	6.25 ± 0.15
DIABETES	$65.8 \pm 5.23^*$	6.6 ± 0.2	54.1 ± 5.8	6.53 ± 0.21
DIABETES-HIPERTENSIÓN	$65.5 \pm 12^*$	$7.2 \pm 0.14^*$	54.2 ± 3.3	6.7 ± 0.23

* $p < 0.05$ Vs. Control.

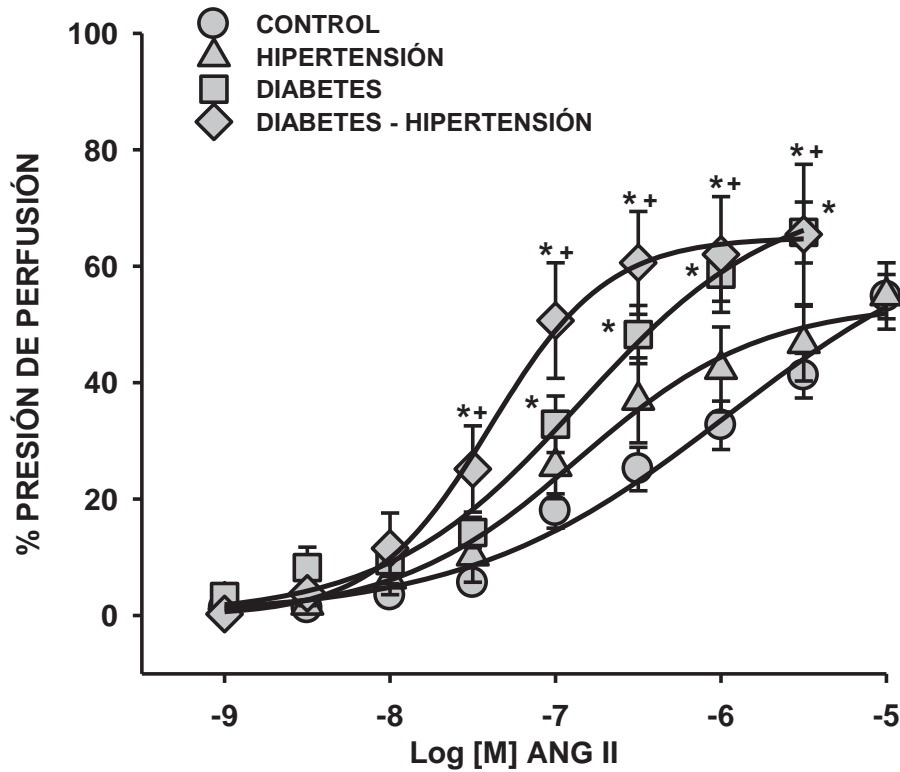


Figura 10. Curva Concentración-respuesta a la angiotensina II (agonista AT₁) en riñón aislado y perfundido de animales Control, hipertensos, diabéticos y diabéticos-hipertensos. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 5-7 experimentos. * $p < 0.05$ Vs. Control, + $p < 0.05$ Vs. hipertensión.

6.9. ANTAGONISMO DE LOSARTÁN:

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la angiotensina II, en presencia de losartán (3.2×10^{-9} M) un antagonista selectivo por el receptor AT₁. En la figura 5 se muestra el bloqueo clásico de un antagonista, desplazando la curva concentración-respuesta a la derecha respecto al control. Dicho desplazamiento fue paralelo a la curva control. El bloqueo de losartán, aunque se hizo a la misma concentración, no fue igual en todos los grupos; en el grupo hipertenso solo se observa un bloqueo discreto que no es significativo, en el grupo diabético existe un bloqueo similar al grupo control, mientras que en el grupo diabético-hipertenso se observó un bloqueo mayor y estadísticamente

significativo comparado con los distintos grupos, sugiriendo que el receptor AT_1 presenta hipersensibilidad por la mayor afinidad por losartán.

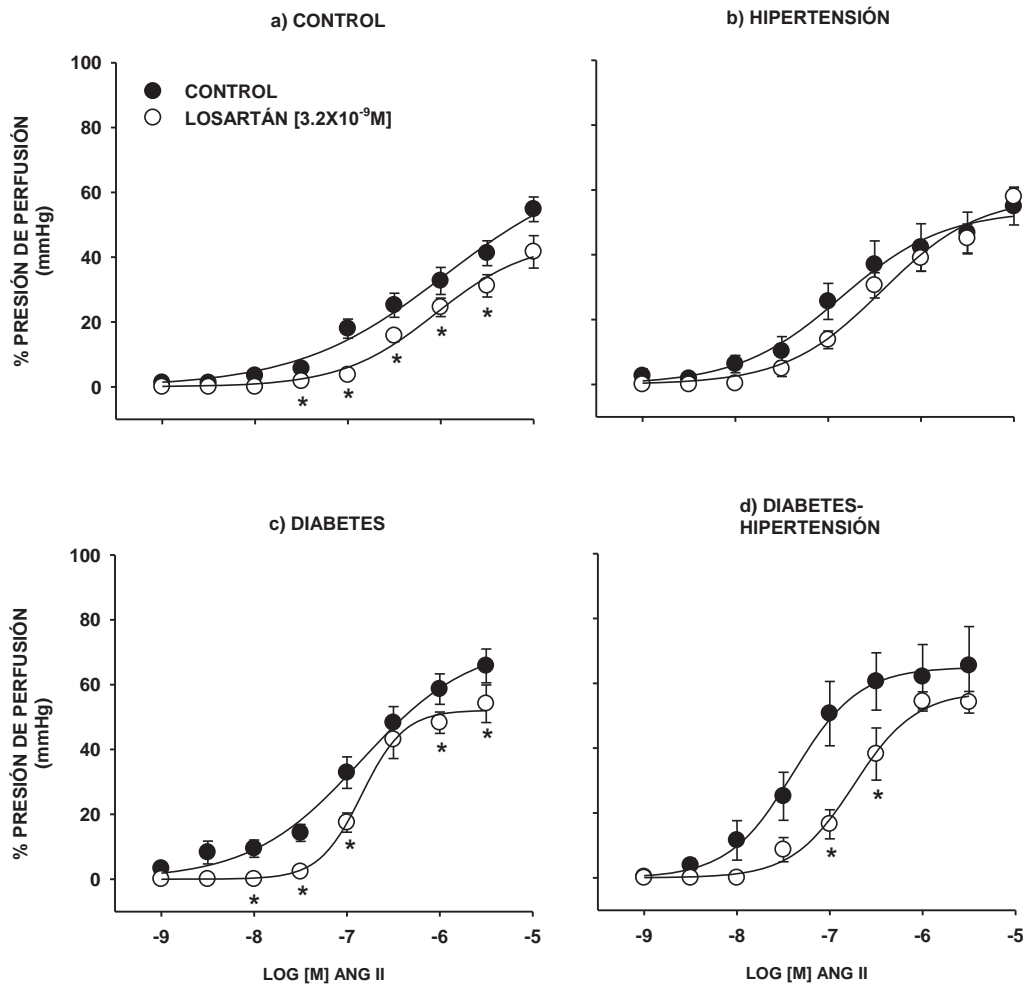


Figura 11. Efecto de losartán, antagonista selectivo AT_1 , sobre la curva concentración-respuesta a la angiotensina II (agonista AT_1) en riñón aislado y perfundido de animales control, hipertensos, diabéticos y diabéticos-hipertensos. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 5-7 experimentos. * $p < 0.05$ Vs. Control.

6.10. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AT₁ EN EL RIÑÓN

Para determinar la expresión proteica del receptor AT₁ en el riñón, se dividió el tejido en corteza y médula renales de los cuatro grupos experimentales. Posterior a esto se realizó una electroforesis para separar las proteínas por masa molecular, después se emplearon anticuerpos específicos contra este receptor y una reacción quimioluminiscente. Las bandas obtenidas para el AT₁ fueron de 40 kDa y para la β -actina fue de 45 kDa que fue la proteína de control interno, aproximadamente.

En ambos tipos de tejido, corteza y médula renales, el receptor AT₁ tiene una tendencia a expresarse menos en el grupo hipertenso, aunque no es estadísticamente significativo, mientras que en los grupos diabético y diabético-hipertenso existe una disminución en la expresión de este receptor ($p < 0.05$). El receptor AT₁, de manera normal, se expresó en mayor cantidad en médula que en corteza renal, evidenciando que la importancia que tiene la angiotensina II de regular la homeostasis de líquidos en la médula renal.

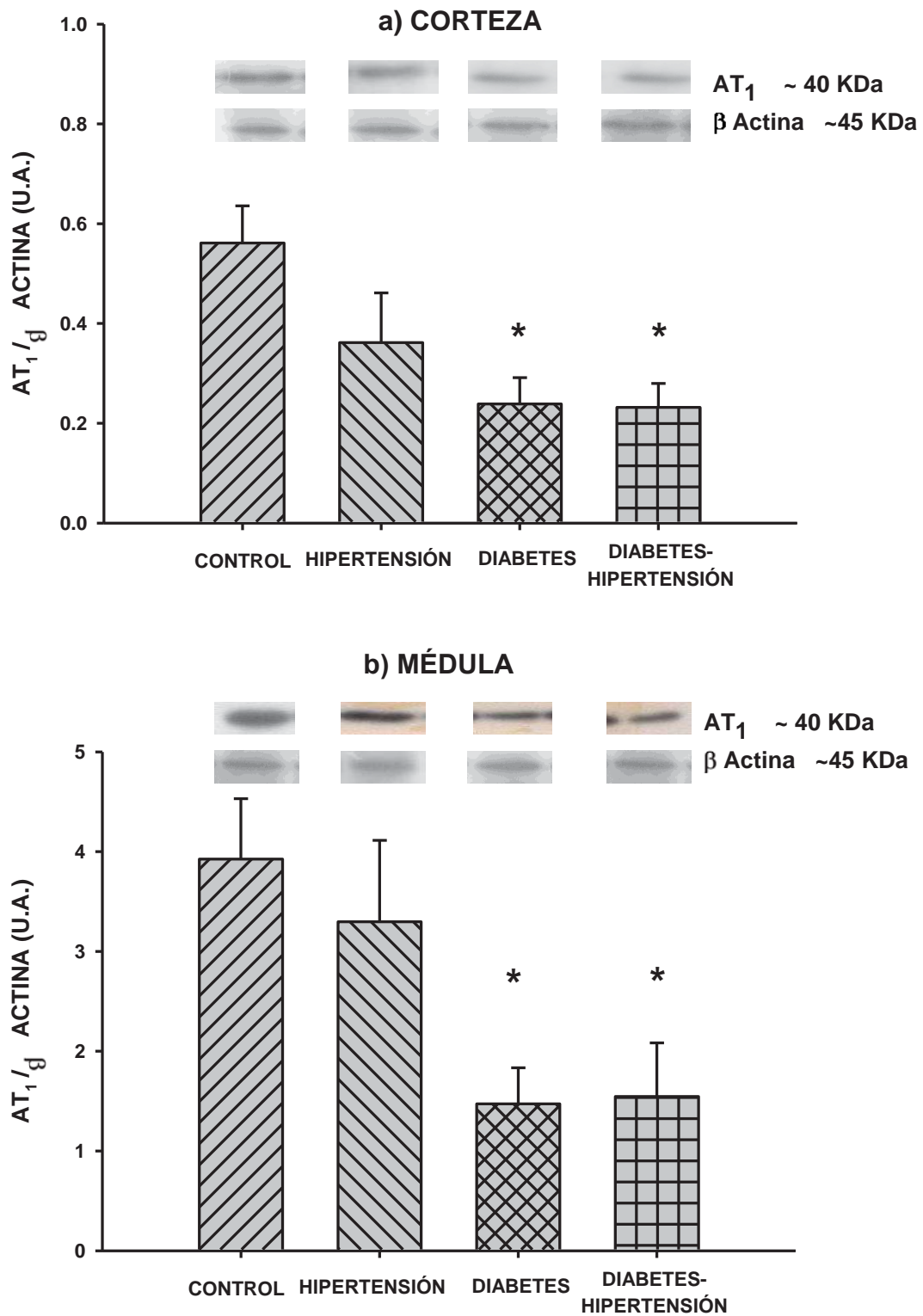


Figura 12. Determinación del receptor AT₁ por medio de la técnica de Western Blot. Cada barra representa el promedio ± el error estándar de 5-7 experimentos. *p<0.05 Vs. Control.

CAPÍTULO IV

7. DISCUSIÓN

7.1. RESUMEN DE RESULTADOS

Los principales hallazgos de este trabajo fueron:

A nivel funcional los riñones de ratas diabéticas-hipertensas, un grupo de interés especial, presentaron hiperreactividad o hipersensibilidad a la angiotensina II, evidenciada por un aumento significativo en el efecto máximo y en la sensibilidad a la angiotensina II.

El receptor AT₁ mostró una participación muy importante en la hiperreactividad a la angiotensina II, ya que el efecto antagónico del losartán es más pronunciado en el grupo de ratas diabéticas-hipertensas. Dicha hiperreactividad proponemos que puede ser debida a dos factores, principalmente, aumento en el número de receptores AT₁ y una hipersensibilidad atribuida un mejor acoplamiento en la vía de transducción de señales.

Por otro lado, la presencia de ambas enfermedades provocó un daño marcado al riñón evidenciado por el coeficiente de masa renal a pesar del corto periodo de exposición a ambas patologías.

La presión basal de perfusión en los grupos con deficiencia de óxido nítrico fue mayor.

A nivel molecular, se encontró la expresión a nivel proteína del receptor AT₁ en corteza y en médula, y de manera sorprendente, esta expresión de dicho receptor disminuyó en el grupo diabético-hipertenso, respecto al control.

7.2. HIPERSENSIBILIDAD A LA ANGIOTENSINA II

Existe una diversidad de estudios que demuestran que la inhibición crónica de la síntesis de ON en la rata produce hipertensión (Zatz *et al.*, 1998), produce daño marcado al riñón (Baylis *et al.*, 1992) y que además activa el sistema renina angiotensina renal, específicamente una respuesta aumentada a la angiotensina II (Rivera *et al.*, 2009; Pollock *et al.*, 1993).

Se conoce que la inhibición de la producción de ON produce elevación de la presión arterial con un incremento en la resistencia vascular periférica (Bernátova *et al.*, 1999) y que además se asocia con subsecuentes cambios estructurales y funcionales.

La pérdida de la vasodilatación mediada por ON puede contribuir a la disfunción endotelial por la producción de especies reactivas de oxígeno como componente clave (Levy *et al.*, 2008). Se ha reportado que la elevación experimental de la presión arterial, causa un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno en las células endoteliales, con lo cual se pueden desencadenar una serie de cambios estructurales y funcionales en los microvasos (Levy *et al.*, 2008). Al respecto, existen reportes donde se indica que la ANG II tiene una importante participación en el proceso de remodelado vascular de arterias pequeñas, estimulando a la NAD(P)H oxidasa con la subsecuente producción de especies reactivas de oxígeno, activando el factor nuclear κ B y un incremento en la expresión de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión (Levy *et al.*, 2008). La ANG II además del efecto vasoconstrictor promueve la generación de especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios que están implicados en muchos de los cambios adversos en la estructura y función microvascular (Levy *et al.*, 2008).

Refiriéndonos al mismo tema, se ha reportado que la deficiencia de la producción de ON lleva a la activación del sistema renina angiotensina provocando una hipersensibilidad a la ANG II en la vasculatura periférica, probablemente atribuido a un aumento en la expresión del receptor AT₁ (Figuroa *et al.*, 2009).

Por otro lado, las pequeñas arterias en sujetos diabéticos e hipertensos, exhiben severo remodelado hipertrófico. La permeabilidad microvascular a moléculas grandes como la albúmina está incrementada en la diabetes, un proceso que está ligado a nefropatía diabética (Levy *et al.*, 2008). Componentes del SRA específicamente la actividad de renina plasmática, no se elevan en la diabetes sostenida, sin embargo, se sabe que existe un daño marcado al riñón por lo que se postula una participación importante de la ANG II intrarrenal en la fisiopatología de la diabetes (Brands *et al.*, 2008).

En la hipertensión dependiente de angiotensina, se ha reportado que existe un aumento en los niveles de angiotensina II intrarrenal, aún cuando la expresión y contenido de renina intrarrenal este suprimido (Navar *et al.*, 2001). Se sabe que la vasculatura del riñón es bastante amplia y por lo tanto las acciones de ANG II sobre la función renal son debidas a una amplia distribución de receptores a la angiotensina II en los distintos segmentos de nefrona y en los tipos celulares que están dentro del riñón.

La gran abundancia de los receptores a la Ang II en el riñón es complementada por niveles altos tisulares de Ang II que son mayores que los niveles plasmáticos. En modelos de hipertensión dependiente de angiotensina, las concentraciones intrarrenales de angiotensina son de 2 a 3 veces más altas que las concentraciones plasmáticas. Además de la formación de ANG II

intrarrenal, el riñón acumula ANG II de la circulación sistémica a través de procesos dependientes del receptor AT₁, ya que se ha demostrado que el bloqueo selectivo de este receptor con antagonistas bloquea dicho proceso, sugiriendo una endocitosis mediada por receptor. Es decir, cuando en el riñón existen altas concentraciones de ANG II se une al receptor AT₁ y de esta manera el complejo formado se internaliza por endocitosis (Navar *et al.*, 2002).

Todos los componentes necesarios para la generación de angiotensina II están presentes dentro del intersticio renal (Navar *et al* 2001). Jandeleit y cols. (2006) demostraron que en endosomas renales están presentes péptidos de angiotensina, la ECA y los receptores a la angiotensina. Existen varias teorías acerca de las funciones que tiene la ANG II internalizada: una posibilidad es que tiene efectos citosólicos. Otra posibilidad es que puede migrar al núcleo (translocación) y exhibir efectos transcripcionales (Navar *et al* 2001). Aunque también se sabe que la perfusión de ANG I y ANG II dentro de capilares peritubulares, causa una vasoconstricción de las arteriolas y eferente, una disminución de la velocidad de filtración glomerular en la nefrona e incrementa la tasa de reabsorción en la fracción proximal.

La presente investigación demuestra que cuando la Diabetes está asociada con hipertensión que se relaciona con una vasoconstricción renal aumentada a la angiotensina II. De esta manera se confirma que tanto la Diabetes como la hipertensión activan el sistema renina angiotensina y además parecen involucrarse en el mantenimiento de la hipertensión y la vasoconstricción renal descrita en este modelo.

7.3. EFECTO DE LOSARTÁN SOBRE LA CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II

En el presente trabajo, demostramos que el losartán, un antagonista selectivo para el receptor AT_1 , bloquea la respuesta renovascular a la angiotensina II (Fig. 11). Este resultado confirma que el efecto vasopresor de la ANG II está mediado principalmente por el AT_1 . Además, el bloqueo con losartán resultó tener un comportamiento diferente entre los diversos grupos experimentales, siendo más evidente en el grupo Diabético-hipertenso y aunque no fue estadísticamente diferente (Tabla 5), este comportamiento sugiere que cuando están asociadas ambas patologías se incrementa la sensibilidad del AT_1 por el losartán.

En cuanto a la participación del receptor AT_2 , se ha postulado que tiene un efecto fisiológico antagónico al efecto mediado por el AT_1 . Sin embargo, no se descarta la posibilidad que exista una disminución en la expresión del receptor AT_2 , a nivel proteína, que podría estar involucrado en el mecanismo prohipertensivo del L-NAME.

Nuestros datos soportan la hipótesis de que durante la Diabetes Mellitus y la hipertensión arterial existe un aumento a la respuesta presora a la angiotensina II en el riñón, sin embargo, esta hiperreactividad no puede ser atribuida a un aumento en la expresión del receptor AT_1 , contrariamente, el estudio de Western Blot mostró que hay una disminución significativa en la expresión de este receptor, tanto en la corteza como en la médula renales.

7.4. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AT_1 EN CORTEZA Y MÉDULA RENALES

El aumento en la vasoconstricción renal inducido por ANG II puede ser debido a un incremento en el número de receptores AT_1 en el riñón. Por lo cual

exploramos la posibilidad de que una alteración en la expresión del AT₁ pueda ser la responsable de la respuesta renal aumentada a la ANG II. Sin embargo, nuestros datos mostraron que no existe tal aumento, contrariamente, existe una disminución significativa en la expresión de este receptor. Aunque no descartamos un incremento en la afinidad del AT₁ o mecanismos de transducción de señales relacionados con la activación de dicho receptor.

El receptor AT₁ se ha localizado en células de músculo liso vascular a través de toda la vasculatura renal, incluyendo arteriolas aferentes y eferentes, células mesangiales (Navar *et al.*, 2001). También hay sobre el borde de túbulo proximal, membranas basolaterales, túbulos distales, ductos colectores, podocitos glomerulares y células de la mácula densa.

En la hipertensión se ha reportado que el receptor AT₂ está involucrado en la vasodilatación arteriolar proviendo un mecanismo contrarregulatorio que disminuye el tono vascular debido a la estimulación del AT₁. Asimismo es posible que una expresión disminuida del AT₂ esté involucrada. Se sabe que el receptor AT₂ se expresa en el periodo embrionario y esta expresión disminuye dramáticamente después del nacimiento, sin embargo, los receptores AT₂ se expresan en riñones adultos en túbulos proximales, ductos colectores, células epiteliales glomerulares.

En la figura 12 se observa la expresión del receptor AT₁ y es posible apreciar que el patrón de expresión resultó no ser uniforme en corteza y médula renales ni entre los diferentes grupos experimentales. La angiotensina II en la médula renal es de interés particular porque influye en la hemodinámica medular (Navar *et al.*, 2001). Nuestros resultados concuerdan con reportes previos que muestran que en la médula existe una expresión mayor del

receptor AT₁ que en la corteza renal. Estudios de unión con radioligandos indican que la densidad de receptores a la ANG II es tres veces mayor en la médula que en corteza renal, aproximadamente. La combinación de niveles altos de ANG II en la médula con la densidad alta de receptores a la ANG II soporta la participación de este péptido en la regulación de la hemodinámica y de la función tubular en la médula (Navar *et al.*, 2001). La médula renal está inervada por una extensa red de capilares llamados vasos rectos, los cuales están encargados de la formación de una orina concentrada. La presencia de angiotensina II y sus receptores en la nefrona distal representa un sitio potencial de mucha importancia para el control de la regulación del transporte de sodio por la Ang II (Navar *et al* 2001).

7.5. COEFICIENTE DE MASA RENAL

En la figura 7 se observa que existe una hipertrofia en el riñón tanto en Diabetes y en Diabetes-hipertensión, por lo que al respecto en enfermedades renales, la hipertrofia vascular de los capilares peritubulares y glomerulares ha sido notado en diferentes modelos animales y enfermedades renales progresivas humanas y de manera sorprendente parece estar ligada al desarrollo de una perfusión dañada e hipoxia crónica (Levy *et al.*, 2008).

La presencia de ambas enfermedades asociadas en un mismo paciente causa un daño marcado al riñón. Nuestros resultados muestran que la Diabetes por si sola causa un daño importante al riñón, mientras que la formación deficiente de ON en hipertensión parece ser el factor responsable que potencia dicho daño al riñón ya que la hipertensión por si sola no tiene diferencia significativa respecto al control, es decir, en el grupo diabético-hipertenso existe

un efecto sinérgico provocado por la presencia de ambas enfermedades y el aumento observado es significativo respecto al grupo diabético.

Se sabe que la microcirculación controla la perfusión de tejidos en respuesta a los requerimientos metabólicos, principalmente (Levy *et al.*, 2008). Una adecuada perfusión a través de la microcirculación de los diferentes tejidos y órganos permite o se considera esencial para la integridad de su buen funcionamiento (Levy *et al.*, 2008). Cuando existe una inadecuada perfusión, puede llevar a la disfunción de órganos y tejidos, asociados con condiciones crónicas en las que se incluye hipertensión, obesidad y Diabetes Mellitus (Levy *et al.*, 2008).

Sin embargo, la resistencia vascular periférica total a menudo se incrementa durante la hipertensión (Figuroa *et al.*, 2009), aún cuando la hipertensión es iniciada por retención de sodio o expansión del volumen. En cuanto a la elevada presión arterial también se ha sugerido a causar efectos directos e indirectos de diversas hormonas como ANG II, norepinefrina que llevan a contraer la vasculatura periférica (Hall, 2003).

Los modelos experimentales de hipertensión inicialmente no involucran retención de sodio (Hall, 2003). El mantenimiento crónico de una presión arterial alta depende de los cambios en la función renal que dirigen la natriuresis, que es la excreción de una cantidad de sodio en orina superior a la normal, a presiones arteriales altas. El aumento en la presión arterial entonces, sirve para mantener el balance de sodio vía natriuresis a pesar de la función renal excretoria dañada (Hall, 2003). Pequeños cambios en la presión de la arteria renal causa grandes alteraciones en la excreción de agua y sodio que persisten mientras se altera la presión de la arteria renal (Hall, 2003).

En el riñón y en estados tempranos de diabetes es curioso que se caractericen por un incremento en la tasa de filtración glomerular y el balance de sodio, aún cuando la presión arterial es normal o incluso baja (Brands *et al.*, 2008). Al respecto, se ha postulado que la presión arterial no tiene un efecto a largo plazo sobre la excreción de sodio y que la presión de natriuresis no es el principal controlador a largo plazo de la presión arterial (Hall, 2003). La presión de natriuresis, está alterada en todas las formas de hipertensión.

La obesidad incrementa la reabsorción renal de sodio y daña la natriuresis por activación del sistema renina angiotensina y el sistema nervioso simpático por alterar las fuerzas intrarenales físicas (Hall *et al.*, 2003). La hiperglucemia en la diabetes incrementa la reabsorción tubular proximal de sodio más de lo que puede ser considerado solo para el balance tubuloglomerular, sugiriendo que este es un evento primario (Brands *et al.*, 2008). Así hay evidencia de que la ANG II y quizá la glucosa por si misma imparten una influencia retenedora de sodio sobre los riñones en Diabetes (Brands *et al.*, 2008). La hiperglucemia sostenida causa natriuresis y disminuye el balance de sodio, ya que cuando se induce Diabetes, esta incrementa la excreción urinaria de sodio (Brands *et al.*, 2008).

7.6. PRESIÓN BASAL DE PERFUSIÓN ALTERADA

En la figura 8 se muestra que los riñones en condiciones basales de perfusión no tienen el mismo valor, solo las ratas que recibieron tratamiento hipertensivo, es decir, las hipertensas y diabéticas-hipertensas, son las que presentan una presión basal mayor, indicando que la inhibición de la síntesis

de ON puede ser la responsable de la ausencia del tono normal de la vasculatura renal.

La hipertensión es causada por mecanismos que incrementan la resistencia vascular periférica o el gasto cardiaco, en tanto los riñones de alguna manera logran adaptar el aumento en la presión arterial, teniendo como un resultado cambios intrarenales o neurohumorales que alteran la función renal (Hall, 2003).

Los cambios en la presión de perfusión renal tienen un efecto a largo plazo sobre la excreción de agua y sodio (Hall, 2003). La excesiva secreción de hormonas antinatriuréticas como aldosterona y angiotensina II típicamente causan solo retención de sodio transitoria. De acuerdo al concepto de retroalimentación de fluidos cuerpo-riñones, aldosterona y angiotensina II reducen la capacidad excretoria renal, iniciando una secuencia de eventos que elevan la presión arterial (Hall, 2003). El incremento en la presión arterial entonces sirve para restaurar la excreción de sodio a valores normales vía natriuresis.

Se ha visto que al inicio de un estado hiperglucémico, existe un estimulación del sistema renina angiotensina y es una compensación para la natriuresis y diuresis inducida por glucosa, siendo esta activación esencial para prevenir una disminución en la presión arterial (Brands *et al.*, 2008), ya que si se bloquea a la ECA se obtiene una disminución de la presión arterial y de esta manera se restaura el balance de sodio (Brands *et al.*, 2008).

Los efectos natriuréticos y diuréticos de la hiperglucemia son atribuidos principalmente a su efecto sobre la reabsorción tubular disminuida. La perturbación inicial en contra de la homeostasis de fluidos en la Diabetes es la

diuresis osmótica (Brands *et al.*, 2008). Sin que haya un aumento en la TFG, las acciones retenedoras de sodio de ANG II predominan y requieren un incremento en la presión arterial para mantener el balance de sodio (Brands *et al.*, 2008).

Es por eso que durante mucho tiempo se han usado agentes antihipertensivos que actúan principalmente sobre la vasodilatación y en particular los que son efectivos en mejorar la estructura microvascular, en tanto los antihipertensivos que actúan principalmente por reducir el gasto cardiaco no son efectivos o recomendables para dicho efecto. La inhibición de la ECA ha mostrado a mejorar la estructura microvascular en hipertensión experimental como también en pacientes hipertensos. Por otro lado, en pacientes hipertensos como en individuos hipertensos asociados con Diabetes tipo 2 mejora la estructura de arterias de resistencia.

El principal interés que tienen los investigadores es enfocarse a las anomalías de la vasoconstricción como primera causa de la hipertensión, ya que se ha observado grandes anomalías en el incremento de las resistencias vasculares periféricas (Hall, 2003).

Cuando se mantiene una tasa normal de excreción de sodio a pesar de una presión arterial alta indica que la natriuresis es reprogramada en hipertensión crónica (Hall, 2003). Es correcto que la inducción de la Diabetes sin un incremento en la TFG podría resultar en una hipertensión por las acciones opuestas de ANG II (Brands *et al.*, 2008).

En la anatomía del riñón se sabe que el tejido adiposo casi encapsula completamente el riñón, pero en sujetos obesos penetra dentro de la medula renal causando compresión y presión intrarenal aumentada (Hall, 2003). Por lo

tanto, la presión intrarenal aumentada causada por grasa circundante incrementa la presión abdominal que puede dañar los riñones, la natriuresis y además contribuye a la hipertensión asociada con obesidad (Hall, 2003). Una excesiva adiposidad puede causar cambios microvasculares en la resistencia vascular periférica y consecuentemente tiende a incrementar la presión arterial.

La obesidad crónica también causa cambios estructurales marcados en los riñones que eventualmente llevan a la pérdida de la función de la nefrona, incremento en la presión arterial e insuficiencia renal severa en algunos casos (Hall *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que los sujetos obesos usualmente tienen incrementos en la actividad de renina plasmática, angiotensinógeno plasmático, actividad de ECA, y niveles de ANGII plasmático. Una participación significativa para la Ang II en estimular la reabsorción de sodio, natriuresis renal dañada y causar hipertensión en obesidad es soportada por encontrar que el tratamiento de perros obesos con IECAs o ARAs atenúa la presión arterial (Hall, 2003). Estudios en pacientes con DM2 quienes usualmente tienen sobrepeso, claramente indican que los IECA's y ARA's disminuyen la progresión de enfermedades renales (Hall, 2003).

Por ejemplo, mas del 90 % de las ratas obesas Zucker, que es un modelo de nefropatía diabética, mueren de insuficiencia renal terminal, sin embargo si se da una restricción de comida de al menos 20%, marcadamente se reduce la insuficiencia renal e incrementa el periodo de vida de estos animales (Hall *et al.*, 2003).

Aunque hay estudios realizados a largo plazo sobre los efectos de la restricción de comida o pérdida de peso y su impacto sobre la función renal en

humanos, es claramente aceptado que la obesidad este estrechamente relacionada con dos de las principales causas de insuficiencia renal terminal, diabetes e hipertensión (Hall *et al.*, 2003).

8. CONCLUSIÓN

La respuesta vasoconstrictora a la angiotensina II está aumentada en vasculatura renal de ratas diabéticas y diabéticas con hipertensión subyacente. La activación de los receptores AT₁ están asociados a hipersensibilidad de la vasculatura renal en diabetes asociada con hipertensión.

La expresión de receptor AT₁ renal disminuye en el grupo diabético-hipertenso sugiriendo que la hipersensibilidad a angiotensina II es debido a cambios en la afinidad del receptor AT₁ o mecanismos post-transduccionales.

9. REFERENCIAS

- Arias Pablo. *Páncreas endócrino*. In: Best and Taylor. Bases fisiológicas de la práctica médica. 13a edición en español ed. Edit. Médica panamericana; **2003**. p. 701-32.
- Baylis Christine, Mitruka Brij, Deng Aihua. *Chronic Blockade of Nitric Oxide Synthesis in the Rat Produces Systemic Hypertension and Glomerular Damage*. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 90, 278-281. **1992**. Departments of Physiology and *Pathology, West Virginia University, Morgantown, West Virginia 26506.
- Brands MW, Labazi H. *Role of glomerular filtration rate in controlling blood pressure early in diabetes*. Hypertension **2008** August;52(2):188-94.
- Braxton D.Mitchel, Laura A.Almasy, David L.Rainwater, Jennifer L.Schneider, John Blangero, Michael P.Stern, and Jean W.MacCluer. *Diabetes and Hypertension in Mexican American Families: Relation to Cardiovascular Risk*. American Journal of Epidemiology 149 número 11, 1047-1056. **1999**. The Johns Hopkins University School of Hygiene and Public Health.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report*. JAMA **2003** May 21;289(19):2560-72.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. *The Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 6) report*. Covering Arch Intern Med **1997** Dec 19;157:2413-2446.
- Cruz Corchado Mariela. *Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México*. Archivos de cardiología de México 71 suplemento 1, 192-197. **2001**. Subdirección de Enfermería. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". (INCICH. Juan Badiano No. 1, 14080 México, D.F.) Tel: 55732911 Ext. 1150.
- Cruz Mérida Aarón, León Hernández Francisco Javier, Hernández y Hernández Héctor. *Regulación normal de la presión arterial sistémica*. Revista mexicana de Cardiología 15, Número 1, 30-41. **2004**.
- Deedwania Prakash C M. *Hypertension and Diabetes New therapeutic Options*. ARCH INTERN MED 160, 1585-1594. 12-6-**2000**. From the Departments of Medicine, Veterans Affairs Central California Health Care System/University of California, San Francisco, School of Medicine Program, Fresno, and Stanford University, Palo Alto, Calif., American Medical Association.

-
- Diamond MP, Chauhan S, Kruger M, Subramanian M. *Values of fasting glucose levels, glucose tolerance tests, and glucose-insulin ratios as predictors of glucose tolerance.* Fertil Steril **2003** October;80(4):1022-5.
- Duarte Mariano, Dvorkin Mario A. *Presión arterial.* In: Best and Taylor, ed. Bases fisiológicas de la práctica médica. 13a edición en español ed. Editorial médica panamericana; **2003.** p. 241-61.
- Elsayed EF, Tighiouart H, Griffith J, Kurth T, Levy AS, Salem D, Sarnak MJ, Weiner DE. *Cardiovascular disease and subsequent kidney disease.* Arch Intern Med **2007** June 11;167(11):1130-6.
- Federación Internacional de Diabetes. Diabetes Care **2007.**
- Félétoú Michel, Germain Martine, Thuriéau Christophe, Fauchère Jean-Luc, Canet Emmanuel. *Agonistic and antagonistic properties of the bradykinin B2 receptor antagonist, Hoe 140, in isolated blood vessels from different species.* British Journal of Pharmacology 112, 683-689. **1994.** Institut de Recherches Servier, 11 rue des Moulineaux, 92150 Suresnes, France, Macmillan Press Ltd.
- Figuroa-Guillén Edgar Saúl, Castro-Moreno Patricia, Rivera-Jardón Felipe Francisco, Gallardo-Ortiz Itzell Alejandrina, Ibarra-Barajas Maximiliano, Godínez-Hernández Daniel. *Angiotensin II Pressor Response in the L-NAME-Induced Hypertensive Pithed Rat: Role of the AT1 Receptor.* The Proceedings of the Western Pharmacology Society 52, 54-56. **2009.**
- Ghafourifar Pedram, Sen Chandan K. *Mitochondrial nitric oxide synthase.* Frontiers in bioscience 12, 1072-1087. 1-1-**2007.** Department of surgery and Davis Heart and Lung Research Institute, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA.
- Giebisch Gerhard, Windhager Erich. *Organization of the urinary system.* In: Walter F.Boron, Emile L.Boulpaep, eds. *MEDICAL PHYSIOLOGY.* updated edition ed. Elsevier Saunders; **2005.** p. 737-73.
- Guyton Arthur C. MD, Hall John E. PhD. *Formación de orina por los riñones: filtración glomerular, flujo sanguíneo renal y su control.* In: Publishing Director: Linda Belfus, Acquisitions Editor:William Schmitt, Managing Editor: Rebecca Gruliow, Publishing Services Manager: Tina Rebane, Project Manager: Mary Anne Folcher, Design Manager: Steven Stave et al., eds. *Fisiología médica.* 11a ed. Elsevier Saunders Inc.; **2006.** p. 307-26.
- Hall JE. *The kidney, hypertension, and obesity.* Hypertension **2003** March;41(3 Pt 2):625-33.
- Hall JE, Kuo JJ, da Silva AA, de Paula RB, Liu J, Tallam L. *Obesity-associated hypertension and kidney disease.* Curr Opin Nephrol Hypertens **2003** March;12(2):195-200.

- Hassing LB, Hofer SM, Nilsson SE, Berg S, Pedersen NL, McClearn G, Johansson B. *Comorbid type 2 diabetes mellitus and hypertension exacerbates cognitive decline: evidence from a longitudinal study*. Age Ageing **2004** July;33(4):355-61.
- Hoffman Brian B. *Terapéutica de la hipertensión*. In: Goodman and Gilman, ed. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11 ed. McGraw-Hill interamericana; **2007**. p. 845-68.
- Ishii Naohito, Patel Kaushik P., Lane Pascale H., Taylor Traci, Bian Ka, Murad Ferid, Pollock Jennifer S., Carmines Pamela K. *Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with Diabetes Mellitus*. Journal of the American Society of Nephrology 12, 1630-1639. **2001**. Department of physiology and biophysics, University of Nebraska College of Medicine, 984575.
- Jackson Edwin K. *Diuréticos*. In: Goodman and Gilman, Dr José Rafael Blengio Pinto, Dr. Jorge Orizaga Samperio, Dra. Ana María Pérez-Tamayo Ruiz, eds. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a ed. **2007**. p. 737-69.
- Jackson Edwin K. *Renina y angiotensina*. In: Goodman and Gilman, Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker, eds. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a ed. McGraw-Hill Interamericana; **2007**. p. 789-821.
- Jaime Sepúlveda. *Encuesta Nacional de Salud*. Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, colonia Santa María Ahuacatlán. 62508 Cuernavaca, Morelos, México.; **2000**. Report No.: 1.
- Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. *Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system*. Endocrinol Metab Clin North Am **2006** September;35(3):469-90, vii.
- Jensen PK, Christiansen JS, Steven K, Parving HH. *Renal function in streptozotocin-diabetic rats*. Diabetología **1981** October;21(4):409-14.
- Kim Shokei, Iwao Hiroshi. *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacological reviews 51, Número 1, 11-32. **2000**. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.
- Kobori Hiroyuki, Nangaku Masaomi, Navar L. Gabriel, and Nishiyama Akira. *The intrarenal renin-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. Pharmacological reviews 59, Número 3, 251-287. **2007**. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.
- Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaut E, Safar ME, Struijker-Boudier HA. *Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus*. Circulation Research **2008** August 26;118(9):968-76.

-
- Lim HS, MacFadyen RJ, Lip GY. *Diabetes mellitus, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the heart*. Arch Intern Med **2004** September 13;164(16):1737-48.
- Masharani Umesh MBMU. *Diabetes Mellitus e hipoglucemia*. In: Lawrence M.Tierney JR, Stephen J.McPhee, Maxine A.Papadakis, eds. Diagnóstico clínico y tratamiento. 41 traducido de la 44a edición en inglés ed. Manual moderno; **2006**. p. 1041-81.
- Matsubara Hiroaki. *Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases*. Circulation research 83, 1182-1191. **1998**. American Heart Association Inc.
- Mattson David L., Cowley Jr.Allen W. *Nitric Oxide and hypertension*. In: Carey Robert M. MM, ed. Hypertension and hormone mechanisms. Totowa, New Jersey 07512: Contemporary endocrinology; **2007**. p. 225-44.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication*. Biochem Pharmacol **1989** June 1;38(11):1709-15.
- Navar LG, Nishiyama A. *Intrarenal formation of angiotensin II*. Contrib Nephrol **2001**;(135):1-15.
- Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. *Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension*. Hypertension **2002** February;39(2 Pt 2):316-22.
- Nour-Eddine Rhaleb, Xiao-Ping Yang, Masahiko Nanba, Edward G.Shesely, Oscar A.Carretero. *Effect of Chronic Blockade of the Kallikrein-Kinin System on the Development of Hypertension in Rats*. American Heart Association, Inc. 37, 121-128. **2001**. Hypertension.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Madrid; **2007** Aug 29.
- Paniagua R, Ramos A, Fabian R, Lagunas J, Amato D. *Chronic kidney disease and dialysis in Mexico*. Perit Dial Int **2007** July;27(4):405-9.
- Paniagua R, Ramos A, Fabian R, Lagunas J, Amato D. *Chronic kidney disease and dialysis in Mexico*. Perit Dial Int **2007** July;27(4):405-9.
- Prieto-Carrasquero Minolfa C., Kobori Hiroyuki, Navar L.Gabriel. *The intrarenal renin-angiotensin system*. In: Robert M.Carey MM, ed. Hypertension and Hormone Mechanisms. Humana Press Inc. Totowa New Jersey; **2007**. p. 3-22.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Treatment of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 5-20. 26-1-**2003**. American Diabetes Association.
- Rivera-Jardón Felipe Francisco, Castro-Moreno Patricia, Figueroa-Guillén Edgar Saúl, Gallardo-Ortiz Itzell Alejandrina, Godínez-Hernández Daniel,

- Ibarra-Barajas Maximiliano. *Angiotensin II Augments Renal Vasoconstriction via AT1 Receptors in L-NAME-induced Hypertensive Rats*. The Proceedings of the Western Pharmacology Society 52, 47-49. **2009**.
- Rojas Rosalva, Oswaldo Palma, Ivet Quintana. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. D.R. © Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Col. Santa María Ahuacatlán. 62508 Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006. Report No.: Primera edición, septiembre de **2006**.
- Ross Sarah, Macleod Mary-Joan. *Hypertension in Diabetes: a perspective from clinical pharmacology*. The British Journal of Diabetes and Vascular Disease 3, 252-256. **2003**. Department of Clinical Pharmacology, Ward 12, Aberdeen Royal Infirmary, Foresterhill, Aberdeen, AB25 2ZN, UK.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD. *Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction*. Clin Sci (Lond) **2005** August;109(2):143-59.
- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. *Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system*. Circulation **2007** July 3;116(1):85-97.
- Secretaría de salud. *Encuesta Nacional de Salud*. **2005**. Report No.: 1.
- Singer Gregory M., Setaro John F., Black Henry R. *Goal-oriented hypertension management in diabetic and nondiabetic patients*. In: Carey Robert M. MM, ed. Hypertension and hormone mechanisms. 1a ed. Totowa, New Jersey 07512: Humana Press Inc; **2007**. p. 187-203.
- Sosa-Luna Carlos Armando, Astudillo-de la Vega Horacio, Sánchez-González Dolores Javier, Martínez-Salas Sergio Gabriel, Valdez-Espinosa Ramón, Villalobos-Molina Rafael, Ibarra-Barajas Maximiliano. *Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vasculatura renal de ratas hipertensas*. Rev Sanid Milit Mex 2005; 59(1) , 20-35. 17-1-**2005**. Cerrada de Palomas S/N esquina con Periférico, Escuela Médico Militar, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la EMGS. Torre de Laboratorios 2o. Piso. Col. Lomas de San Isidro. Del. Miguel Hidalgo. C.P. 11200. Tel.: 5623-1290., Medigraphic Artemisa en línea.
- Sowers James R., Epstein Murray, Frohlich Edward D. *Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: An Update*. Hypertension journal of the american heart association 37, 1053-1059. **2001**. 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX, American heart association.
- Sowers James R. *Insulin resistance and hypertension*. In: Carey Robert M. MM, ed. Hypertension and hormone mechanisms. Contemporary endocrinology. R. M. Carey © Humana Press Inc., Totowa, NJ; **2007**. p. 175-86.

-
- Sowers JR. *Treatment of hypertension in patients with Diabetes*. Arch Intern Med **2004** September 27;164(17):1850-7.
- Stephen N.Davis. *Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endócrino*. In: Goodman and Gilman, ed. Las bases farmacológicas de la terapéutica. undécima edición ed. McGraw-Hill Interamericana; **2007**. p. 1613-45.
- Sutters MMU. *Systemin Hypertension*. In: Stephen N.Davis, Lawrence M.Tierney Jr., Maxine A.Papadakis, M, eds. Current Medical Diagnosis. **2008**. p. 370-97.
- Taddei Stefano, Virdis Agostino, Ghiadoni Lorenzo, Salvetti Antonio. *Hipertensión y disfunción endotelial*. Cardiovascular risk factors. Inteligencia Médica 7, Número 1. **1998**. Clínica médica I, Universidad de Pisa, Pisa, Italia. Vía Roma 67. 56100.
- Touyz Rhian, Schiffrin Ernesto L. *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. Pharmacological reviews 52, Número 4, 639-672. **2000**. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.
- Touyz RM. *Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure-implications in the pathogenesis of hypertension*. Can J Cardiol **2000** September;16(9):1137-46.
- Vander Arthur J. MD. *Funciones y estructura de los riñones*. In: Dr.José Pérez Gómez, ed. Fisiología renal. 4a ed. McGraw-Hill Interamericana; **1993**.
- Vander Arthur J. MD. *Procesos renales básicos*. In: Dr.José Pérez Gómez, ed. Fisiología renal. 4a ed. McGraw-Hill Interamericana.; **1993**.
- Ward Donald T., Yau S.Kam, Mee Andrew P., Mawer E.Barbara, Miller Christopher A., Garland Hugh O., Riccardi Daniela. *Funcional, Molecular, and Biochemical Characterization of Streptozotocin-Induced Diabetes*. Journal of the american society of nephrology 12, 779-790. **2001**. School of Biological Sciences, Oxford Road, Manchester, M13 9PT, United Kingdom.
- Wichi Rogerio B., Farah Vera, Chen Yanfang, Irigoyen María Claudia, Morris Mariana. *Deficiency in angiotensin AT1a receptors prevents diabetes-induced hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292, 1184-1189. **2007**. Dept. of Pharmacology and Toxicology, Boonshoft School of Medicine, Wright State Univ., 3640 Colonel Glenn Hwy., Dayton, OH, 45435., The American Physiological Society.
- Zatz Roberto, Baylis Christine. *Chronic nitric oxide inhibition model six years on*. Hypertension 32, 958-964. **1998**. American heart association, Inc.

Zenteno Juan Carlos, Kofman Alfaro Susana. *Aspectos genéticos de la hipertensión*. Revista Médica del Hospital General de México SS 66 número 4, 218-223. **2003**. Medigraphic.com.

Zhang Y, Lee ET, Devereux RB. *Prehypertension, diabetes, and cardiovascular disease risk in a population based sample: The strong heart study*. Hypertension 47, 410-414. **2006**. DOC NEWS.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature **2001** December 13;414(6865):782-7.

10. ANEXO

Angiotensin II Augments Renal Vasoconstriction *via* AT1 Receptors in L-NAME-induced Hypertensive Rats

Felipe Francisco Rivera-Jardón¹, Patricia Castro-Moreno², Edgar Saúl Figueroa-Guillén¹, Itzell Alejandrina Gallardo-Ortiz², Daniel Godínez-Hernández¹ and Maximiliano Ibarra-Barajas²*

¹Laboratorio de Farmacología, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán 58000, México. ²Laboratorio de Farmacología Cardiovascular, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Iztacapan 54090, México.

*E-mail: maxibarrab@correo.unam.mx

Abstract

The renal renin angiotensin system modulates blood pressure *via* the action of angiotensin II at type 1 (AT1) and type 2 (AT2) angiotensin receptors. It has been proposed that there is an increased pressor response to angiotensin II (ANG II) in the hypertensive rat kidney. We determined the role of the AT1 receptor in L-NAME-induced hypertension. Male Wistar rats (250-300 g) were divided into control (tap water) and L-NAME (50 mg/kg/day/2 weeks) treated groups. Concentration-response curves to ANG II were constructed in isolated perfused kidneys and AT1 receptor expression was determined by Western blot in the renal cortex, medulla and papilla. ANG II evoked an increase in perfusion pressure in kidneys of both control and L-NAME-treated rats in a concentration-related manner. In L-NAME-treated rats, a greater maximal effect was observed compared to control rats (160 ± 13 vs. 138 ± 8 mmHg; $p < 0.05$, respectively), suggesting that L-NAME promoted ANG II hypersensitivity. In both, control and L-NAME groups, the response to ANG II was blocked by the selective AT1 receptor antagonist losartan (1×10^{-8} and 3.16×10^{-8} M). AT1 receptor expression in kidney cortex, medulla and papilla did not show significant differences between groups. Our results demonstrate that AT1 receptor stimulation is related to renal vasculature hypersensitivity in L-NAME-induced hypertension.

Introduction

The renin angiotensin-aldosterone system (RAS) plays an important role in regulating blood volume and systemic vascular resistance, which together influence cardiac output and arterial pressure. There are three important components to this system: renin, ANG II and aldosterone. ANG II, the effector peptide of the RAS regulates vascular tone and maintains normal vessel structure and function. Elevated levels of ANG II have been implicated in the pathophysiological processes that occur in hypertension. Recent studies have shown that ANG II has significant pro-inflammatory actions in the vascular wall, including the production of reactive oxygen species, inflammatory cytokines, and adhesion molecules [1-3], all of which are known to contribute to the inflammatory responses and hypersensitivity of blood vessels to vasoconstrictor agents occurring in hypertension. Chronic L-NAME administration increases plasma renin [4-6], cardiac and vascular angiotensin converting enzyme (ACE) activity [6], and causes a transient increase in both AT1 and AT2 receptors in the heart [7].

Thus, the deficiency of nitric oxide (NO) exerts deleterious effects on the cardiovascular system by several mechanisms, such as activation of RAS, oxidative stress and inflammatory cytokines. The aim of the present study was to analyze whether the AT1 receptors are associated to the increased responses to ANG II in isolated perfused kidney from L-NAME-induced hypertensive rats.

Materials and Methods

Animals: Male Wistar rats (250-300 g) were maintained under standard laboratory conditions with free access to food and water. All animal procedures were carried out in accordance with Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (Ministry of Agriculture, NOM-062-ZOO-1999, Mexico) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Rats were divided into two groups: control and rats treated with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME (50 mg/kg/day/2 weeks) in the drinking water. Systolic blood pressure was measured weekly by tail cuff plethysmography method using a LE 5007 automatic blood pressure recorder (Letica, PanLab, Barcelona Spain).

Isolated Perfused Kidney Preparation: Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), and the right kidney was isolated and perfused with Krebs solution warmed (37°C) and oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂), composition mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; EDTA, 0.026; glucose, 11.1, pH 7.4). A polyethylene-50 cannula was placed into the right renal artery and the kidney was removed, attached to the perfusion system and allowed to stabilize for an hour before the experimental protocol. Kidneys were perfused at a constant flow (10 ml/min), and perfusion pressure was monitored by TSD105 pressure transducer (Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, USA) connected to a MP100 analyzer (Biopac). After stabilization period, renovascular responses (i.e., changes in perfusion pressure) to increasing concentration of ANG II, (bolus of 10 µL; 3.16x10⁻⁶ to 1x10⁻⁵ M, in half-log increments) were assessed. In some experiments, the selective AT₁ receptor antagonist losartan (1x10⁻⁸ and 3.16x10⁻⁹ M) was administered in the perfusate 30 min before and during the concentration-responses to ANG II.

Western Blot Analysis: AT₁ receptor expression was determined in homogenates from renal cortex, medulla and papilla. In brief, tissues were homogenized with RIPA buffer, using a cocktail of protease inhibitors (complete Mini, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), centrifuged and protein concentration in the supernatant measured by Lowry method. Proteins (50 µg) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were incubated with goat polyclonal antibody for the AT₁ receptor (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California, USA). After washing, membranes were incubated with anti-goat IgG antibody conjugated to HRP (horseradish peroxidase, 1:1000, Santa Cruz). The immune complexes were detected using enhanced chemiluminescence (horseradish peroxidase-luminol, Santa Cruz) and subjected to autoradiography (hyperfilm, GE Healthcare, Japan). Signals on the immunoblot were quantified using Image-J computer software. The relative presence of AT₁ receptors was normalized with reference protein β-actin (1:1000, Santa Cruz) and anti-goat IgG antibody HRP (1:10000, Zymed Laboratories, California, USA).

Data Analysis and Statistics: Results are expressed as mean ± S.E.M. Differences were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni test. A *p* value less than or equal to 0.05 was considered significant.

Results and Discussion

At the end of the treatment, significant increases in systolic blood pressure was detected in the L-NAME group compared with the control group (control: 111.6

± 1.8 mmHg vs L-NAME: 144.7 ± 3.5 mmHg; *p*<0.05), whereas a decrease in heart rate was observed (control: 373.6 ± 12 BPM vs L-NAME 345.8 ± 6.6 BPM; *p*<0.05).

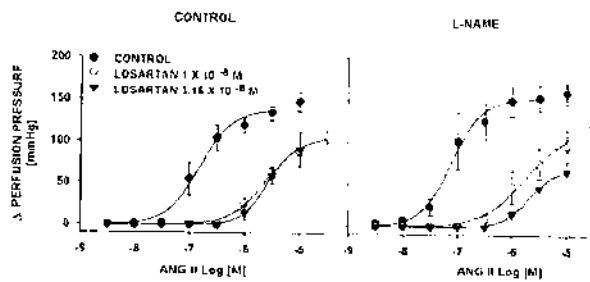


Figure 1. Effect of losartan on concentration-response curves to angiotensin II in isolated perfused kidney from control and treated rats with 50 mg/kg/day L-NAME.

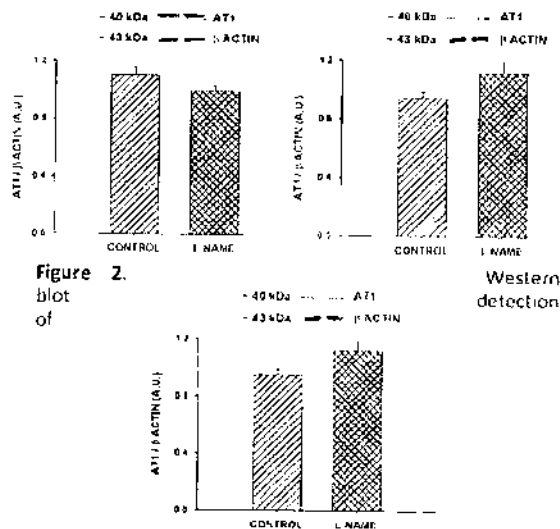


Figure 2. Western blot of angiotensin II type AT₁ receptors in renal tissues with densitometric analysis of receptor protein in control and rats treated with 50 mg/kg/day L-NAME. (A) renal cortex; (B) medulla and (C) papilla. No significant differences in expression were seen in any region.

ANG II caused a concentration-dependent increase in perfusion pressure of the isolated perfused kidney in both control and L-NAME-treated rats. The vasoconstriction response to ANG II was slightly greater in kidney from L-NAME hypertensive rats than normotensive rats (Fig 1). Maximal blood pressure response was greater in L-NAME-treated rats compared with the control group (control: 138 ± 8 mmHg vs L-NAME: 160 ± 13 mmHg; *p*<0.05), whereas *pD*₅₀ values were similar in control and L-NAME-treated

rats (control: 6.8 ± 0.14 vs L-NAME: 7.0 ± 0.2). The selective AT1 receptor antagonist losartan at 1×10^{-8} and 3.16×10^{-8} M provoked a marked right shift of the concentration-response curve to ANG II in both groups (Fig 1). However, the decrease induced by losartan on the maximal effect was greater in L-NAME hypertensive rats.

AT1 receptor protein expression in renal cortex (Fig 2A), medulla (Fig 2B) and papilla (Fig 2C) was similar both in control and L-NAME-induced hypertensive rat.

The present study demonstrated that chronic L-NAME administration is associated to increased renal vasoconstriction to ANG II. Thus, our results confirm previous observations that chronic NO blockade produces activation of the RAS, which seems to be involved in maintaining the hypertension and renal vasoconstriction described in this model [8]. Moreover, we demonstrate that losartan, a highly selective AT1 receptor antagonist, blocks renovascular responses to ANG II. This latter finding confirms that the vasopressor effects of ANG II are mediated mainly by the AT1 receptor. The augmented ANG II-induced vasoconstriction in L-NAME induced hypertension could be due to an increased number of AT1 receptors in the kidney. Therefore, we explored the possibility that an alteration in AT1 receptor expression may account for the greater renal responses to ANG II in L-NAME hypertensive rats.

However, our data demonstrated that AT1 protein receptors were equally expressed in cortex, medulla and papilla from control and hypertensive rats, indicating that changes in AT1 receptor expression are not implicated. Although we cannot discard an increase in AT1 receptor affinity or transduction signaling mechanisms related with receptor activation. It has been reported that AT2 receptor is involved in regulation of arteriolar dilatation, providing a counterregulatory mechanism that diminish the increased vascular tone due to AT1 receptor stimulation. Then it is possible that decreased AT2 expression may be involved. One feature of this model of hypertension is that pressor responses to chronic NOS blockade are similar to those seen after acute NOS inhibition, suggesting NO deficiency. In addition, it has been shown that endothelium removal or acute inhibition of NO synthesis enhances vasoconstrictor responses to a range of agonists [9,10]. Therefore, it is possible that hypersensitivity occurs via amplification of vasoconstrictor systems by removal of the tonic and profoundly important vasodilator system of continual NO production. In conclusion our results show that AT1 receptors activation is associated hypersensitivity of renal vasculature in L-NAME-induced hypertension.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN218406 (MIB) from PAPIIT, DGAPA, UNAM and PAPCA 2008 (MIB) from FES-IZTACALA, UNAM Mexico; CIC-UMSNH 2008, COECYT-HIOECYT-2008 and PROMEP UMSNH PTC-156. F.F.R.J. is a graduate fellow of CONACyT, Mexico.

References

1. Schiffrin, E.L., and Touyz, R.M. (2004) *Am. J. Physiol.* 287, H435–H446.
2. Cheng, Z.J., Vapaatalo, H., and Mervaala, E. (2005) *Med. Sci. Monit.* 11, RA194–RA205.
3. Pauletto, P., and Rattazzi, M. (2006) *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 850–853.
4. Morton, J.J., Beattie, E.C., Speirs, A., and Gulliver, F. (1993) *J. Hypertens.* 11, 1083–1088.
5. Zanchi, A., Schaad, N.C., Osterheld, M.C., Grouzmann, E., Nussberger, J., Brunner, H.R., and Waeber, B. (1995) *Am. J. Physiol.* 268, H2267–H2273.
6. Takemoto, M., Egashira, K., Usui, M., Numaguchi, K., Tomita, H., Tsutsui, H., Shimokawa, H., Sueishi, K., Takeshita, A. (1997) *J. Clin. Invest.* 99, 278–287.
7. Katoh, M., Egashira, K., Usui, M., Ichiki, T., Tomita, H., Shimokawa, H., Rakugi, H., Takeshita, A. (1998) *Circ. Res.* 83, 743–751.
8. Qiu, C., Engels, K., and Baylis, C. (1994) *Am. J. Physiol.* 266, R1470–R1476.
9. Ibarra, M., Meneses, A., Ransanz, V., Castillo, C., and Hong, E. (1995) *Arch. Med. Res.* 26, S177–83.
10. Ibarra, M., López-Guerrero, J.J., Mejía-Zepeda, R., Villalobos-Molina, R. (2006) *Arch. Med. Res.* 37(3), 334–41.