



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“RESPUESTAS VASCULARES Y CAMBIOS TISULARES EN RIÑÓN
DE RATAS HIPERTENSAS INDUCIDAS CON L-NAME: EFECTO
DEL TRATAMIENTO ANTIHIPERTENSIVO”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M.C. Areli Gutiérrez Pérez

Asesor:

D. C. HOMERO REYES DE LA CRUZ

Co-Asesor:

D. C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ

Morelia, Mich. Agosto de 2013.

Años de siembra en buena tierra, para cosechar frutos cargados de conocimiento. Crecimiento intelectual aderezado de hierbas espinosas, de sabores fuertes, de mieles exóticas.

CANTO ÉLFICO PARA EL CAMINO VENIDERO. (J.R.R. Tolkien).

ENT

*Cuando la primavera despliega la hoja del haya y hay savia en las ramas;
cuando la luz se apoya en el río del bosque y el viento toca la cima;
cuando el paso es largo, la respiración profunda y el aire se anima en la montaña,
¡regresa a mí! ¡Regresa a mí y di que mi tierra es hermosa!*

ENT-MUJER

*Cuando la primavera llega a los regadíos y los campos, y aparece la espiga;
cuando en las huertas florecen los capullos como una nieve brillante;
cuando la llovizna y el sol sobre la tierra perfuman el aire,
me demoraré aquí y no me iré, pues mi tierra es hermosa.*

ENT

*Cuando el verano se extiende sobre el mundo, en un mediodía de oro,
bajo la bóveda de las hojas dormidas se despliegan los sueños de los árboles;
cuando las salas del bosque son verdes y frescas, y el viento sopla del oeste,
¡regresa a mí! ¡Regresa a mí y di que mi tierra es la mejor!*

ENT-MUJER

*Cuando el verano calienta los frutos que cuelgan y oscurece las bayas;
cuando la paja es de oro y la espiga blanca y es tiempo de cosechar;
cuando la miel se derrama y el manzano crece, aunque el viento sople del oeste,
me demoraré aquí a la luz del sol, porque mi tierra es la mejor.*

ENT

*Cuando llegue el invierno, el invierno salvaje que matará la colina y el bosque;
cuando caigan los árboles y la noche sin estrellas devore al día sin sol;
cuando el viento sople mortalmente del este, entonces en la lluvia que golpea
te buscaré y te llamaré, ¡y regresaré otra vez contigo!*

ENT-MUJER

*Cuando llegue el invierno y terminen los cantos; cuando las tinieblas caigan al fin;
cuando la rama estéril se rompa y la luz y el trabajo hayan pasado;
te buscaré y te esperaré, hasta que volvamos a encontrarnos:
¡juntos tomaremos el camino bajo la lluvia que golpea!*

AMBOS

*Juntos tomaremos el camino que lleva al oeste
y juntos encontraremos una tierra en donde los corazones tengan descanso.*

DEDICATORIA

In memoriam de mis padres, Héctor Gutiérrez López e Imelda Pérez Villaseñor, quienes durante los años que compartí con cada uno, me enseñaron que la vida sigue, que la mente es una fábrica incansable de sueños, que el honor, el respeto y la lealtad son los valores más grandes de la tierra. Aún en su ausencia física, los siento respaldándome, como guardianes, los siento aquí y ahora, en la mente y en el corazón.

A todas las personas ya sean familiares de sangre, familiares de elección, amigos, compañeros que siempre me han acompañado y enseñado algo sobre mí y sobre la vida.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores: Daniel Godínez Hernández y Homero Reyes de la Cruz que además de ser mis asesores académicos, me enseñaron otras cosas sobre la vida durante la realización de este trabajo. Agradezco las lecciones y su trato cordial y sincero.

A los Doctores: D.C. Salvador Manzo Ávalos, D.C. Pedro López Sánchez, D.C. Jesús Campos García, D.C. Maximiliano Ibarra Barajas y el D.C. Alfredo Saavedra Molina por su participación como parte del comité tutorial y como sinodales, así como por los aportes y sugerencias hechas para la realización del presente proyecto.

A mis hermanos de laboratorio: Mauricio Nahuam Chávez Avilés, César Arturo Peña Uribe, Xochitl Leticia Ruíz Pérez, quienes fueron mi familia, escucharon con paciencia todas mis diarreas mentales, mis divagaciones sobre la vida, me ayudaron cuando me sentía triste o cuando mi fuerza menguaba, me daban ánimos cuando las cosas se ponían difíciles, pero primero que nada, por todo el bullying, las carcajadas, los silencios que compartimos estos 4 años.

Agradezco muy especialmente y desde mi corazón, a los miembros del “Something” Luz María Malagón Quintana y Fernando Gaona Valencia, quienes se encargaron de llenar mi vida de luz, me ayudaron a curar heridas viejas, me dotaron de su eterno amor y me cambiaron la vida para siempre.

A mi clon por estar siempre a mi lado, en las buenas, en las malas y en las peores, convertirse en mi espejo, mi maestra, mi hermana, mi todo.

A todas las personas que transitaron por el laboratorio y que se llevaron un poco de mí con ellas, que hicieron muy amena la estadía y que me enseñaron algo.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

	PÁGINA
Figura 1. Anatomía vascular.....	6
Figura 2. Anatomía renal.....	10
Figura 3. Nefrona.....	12
Figura 4. Irrigación renal.....	17
Figura 5. Fisiología renal.....	23
Figura 6. Vía clásica del sistema renina-angiotensina.....	25
Figura 7. Reacción de producción de óxido nítrico.....	29
Figura 8. Comparación estructural de L-arginina y L-NAME.....	31

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	3
3.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.	5
3.2.1 Endotelio.	5
3.2.2 Disfunción endotelial.	7
3.3 CONTROL RENAL DE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	8
3.4 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA RENAL.	9
3.4.1 Anatomía renal.....	9
3.4.2 Fisiología renal.....	17
3.5 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	24
3.6 ÓXIDO NÍTRICO Y MODELO DE HIPERTENSIÓN INDUCIDA CON L-NAME.....	29
3.7 TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA.....	32
IV. HIPÓTESIS.....	33
V. OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo general.	33
5.2 Objetivos particulares.....	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1 CAPÍTULO 1. “Respuestas vasculares y cambios tisulares en riñón de ratas con hipertensión inducida con L-NAME: participación del sistema renina-angiotensina”.....	34
VII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	44
VIII. ANEXO 1.....	46

I. RESUMEN.

El sistema renina-angiotensina (SRA) se ha considerado como uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo y establecimiento de la hipertensión. Uno de los componentes principales del SRA es el péptido angiotensina II (Ang II) cuyos efectos son mediados, principalmente, a través del receptor a angiotensina II tipo 1 (AT1).

Existe controversia acerca de si los tratamientos que inciden sobre el SRA son capaces de prevenir o retardar el desarrollo de complicaciones renales, como insuficiencia renal e hipertrofia a consecuencia de la hipertensión arterial. Por esta razón, fue de nuestro interés estudiar los efectos del tratamiento con captopril (un fármaco que incide directamente sobre el SRA, inhibiendo a la enzima convertidora de angiotensina) y la hidralazina (un vasodilatador con blancos independientes del sistema), ejercidos sobre las respuestas vasculares y sobre la anatomía renal, en ratas con hipertensión sub-crónica inducida con L-NAME (inhibidor de las óxido nítrico sintasas).

Se observó que el tratamiento antihipertensivo con el captopril y no con la hidralazina, promueve una mayor respuesta presora a la Ang II, lo que sugiere que el riñón cuenta con todos sus mecanismos compensatorios activos, que le permiten mantener su función aún durante la hipertensión arterial subcrónica. Además, el tratamiento con captopril fue capaz de revertir los cambios tisulares renales causados por la patología. Por lo anterior, el uso de captopril retarda la aparición de complicaciones renales durante la hipertensión.

II. ABSTRACT.

Renin-angiotensin system (RAS) is considered the most important mechanism in hypertension development and establishment. The angiotensin II peptide (Ang II) is the major component of RAS and mediates its effects through the angiotensin II type 1 receptor (AT1).

Whether antihypertensive treatments could prevent or retard renal complications in hypertension is controversial. For this reason, the aim of this work was to evaluate the treatment effect on kidney vascular responses and tissular changes in a subchronic hypertension model.

It was observed that captopril preserves the RAS activity in respond to vascular changes required for renal function even after hypertension establishment. Captopril antihypertensive treatment (that directly acts on RAS, inhibiting the angiotensin-converting enzyme) but not with hydralazine (a vasodilator with RAS independent targets), reverses the appearance of histological modifications that could cause kidney failure and organic failure as a complication of arterial hypertension.

Therefore, the captopril treatment could improve the life quality of hypertensive patients.

III. INTRODUCCIÓN.

3.1 HIPERTENSIÓN ARTERIAL.

La hipertensión arterial es un estado patológico caracterizado por un incremento de la presión arterial (presión arterial sistólica (PAS) >140 mm de Hg, y/o presión arterial diastólica (PAD) >90 mm de Hg, como consecuencia de cambios hemodinámicos macro y microvasculares. Por lo tanto, en esta patología existe un desequilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores del organismo. Estos cambios que anteceden en el tiempo a la elevación de la presión, producen lesiones en órganos importantes para el control vascular. En este sentido, uno de los principales órganos blanco de la hipertensión es el riñón, desarrollando a largo plazo hipertrofia renal e insuficiencia renal crónica (Chobanian *et al.*, 2004).

La regulación de la presión arterial es una respuesta integrada y compleja de varios sistemas, incluyendo el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, los riñones y las glándulas adrenales. Estos sistemas modulan el gasto cardiaco, la resistencia vascular periférica y el equilibrio hidroelectrolítico necesarios para mantener los niveles normales de presión (Coffman y Crowley, 2008).

La hipertensión arterial por su causa, se divide principalmente en: hipertensión arterial esencial o primaria e hipertensión arterial secundaria (Tabla 1). Cerca del 90% de los casos de hipertensión se diagnostican como hipertensión esencial, cuyo origen es multifactorial. Involucra factores de predisposición genética y factores exógenos.

La hipertensión arterial secundaria es aquella que aparece como complicación de una patología ya existente, por ejemplo, disminución en la función renal por diabetes mellitus (Chobanian *et al.*, 2004).

En México, el 30.8 % de la población de más de 20 años padece hipertensión, lo que representa a 17 millones de adultos. Más del 50 % de los hombres y más del 60 % de las mujeres de más de 60 años de edad padecen hipertensión. Estudios

epidemiológicos han mostrado que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en casi todos los países del mundo (Olaiz *et al.*, 2006).

Tabla 1. Clasificación de hipertensión respecto a los valores de presión arterial, de acuerdo a la ESH/ESC 2003 y a la SEH-LELHA 2005.

Presión arterial (mm Hg)	NORMOTENSIÓN O HIPERTENSIÓN ARTERIAL CONTROLADA			HIPERTENSIÓN ARTERIAL		
	ÓPTIMA	NORMAL	N-ALTA	GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3
Sistólica	< 120	120-129	130-139	140-159	160-179	≥ 180
Diastólica	y <80	80-84	85-89	90-99	o 100-109	≥ 110
	NORMAL**	PREHIPERTENSIÓN**		ESTADIO 1**	ESTADIO 2**	

ESH: Sociedad Europea de Hipertensión; ESC: Sociedad Europea de Cardiología; SEH/LHELA: Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial.

**Clasificación de hipertensión según el JNC-7 (Chobanian *et al.*, 2004).

3.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

3.2.1 Endotelio.

Los vasos sanguíneos están compuestos por tres capas: la íntima, la media y la adventicia (Fig. 1). Todos los vasos sanguíneos, salvo los sinusoides, están revestidos de una capa continua, única de células poliédricas muy especializadas y metabólicamente muy activas, las células endoteliales, las cuales se encuentran orientadas paralelamente al eje longitudinal del vaso. Al menos en los vasos pequeños, estas células tienen una membrana basal claramente definida por debajo de la cual se extienden finas fibrillas elásticas (subendotelio) que hacen contacto con las células musculares lisas de la capa media. El endotelio se haya dispuesto de tal manera que forma una monocapa que recubre la superficie interna tanto de las arterias, venas, vasos linfáticos, cavidades y válvulas cardíacas, la cámara anterior del ojo, el pulmón, la cavidad epicárdica, entre otros. La unidad funcional del endotelio (célula endotelial) tiene un espesor central de aproximadamente 3-4 μ y de 0.1 μ en los bordes. Generalmente se encuentra acompañada de una célula satélite: el periocito, célula que acompaña al capilar sanguíneo y al linfático, y proporciona una función de sostén y regulación del tono vascular. El endotelio ejerce una función de control sobre la circulación, mediante la producción de diversas sustancias vasoactivas con efectos antagónicos, para así regular el tono y la homeostasis vascular; además, produce sustancias con actividad enzimática e inmunológica; se le atribuye la función de barrera permeable, pero altamente selectiva. Además participa activamente en el proceso de remodelación vascular, la fibrinólisis y la adhesión al endotelio de plaquetas activadas y leucocitos (Velasco y Hernández, 2001).

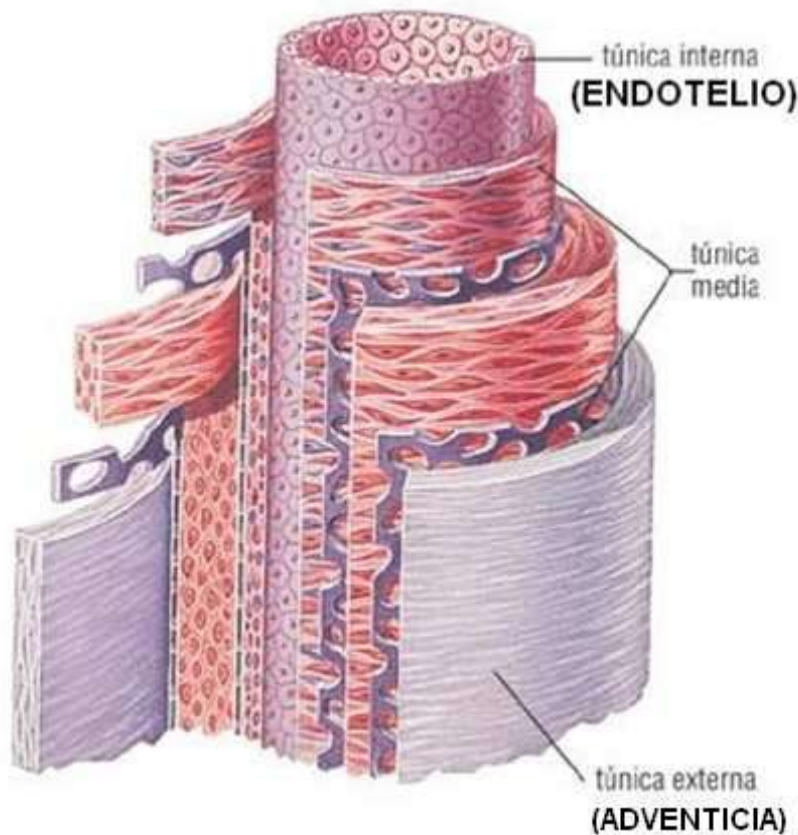


Figura. 1. **Anatomía vascular.** Se muestran las diferentes capas de un vaso sanguíneo, en este diagrama se esquematizan las que conforman una arteria: el endotelio o túnica interna, la túnica media y la túnica externa o adventicia. Modificado de Guyton y Hall 2006.

Las principales sustancias vasodilatadoras liberadas por las células endoteliales incluyen el óxido nítrico, la bradicinina y la prostaciclina. El óxido nítrico (NO) es el vasodilatador endógeno más potente y es el responsable del mantenimiento del tono vascular basal. Se sintetiza en las células endoteliales a partir de la L-arginina por medio de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La bradicinina es otro vasodilatador importante y ejerce su actividad principalmente a través de la estimulación de la síntesis de NO. La prostaciclina (PGI_2) es una prostaglandina derivada del ácido araquidónico con efecto vasodilatador, además participa como antiagregante plaquetario (Velasco y Hernández, 2001).

Las principales sustancias vasoconstrictoras derivadas del endotelio incluyen la Angiotensina II (ANG II) y la endotelina. La Ang II es un potente vasoconstrictor que también ejerce diversos efectos sobre la remodelación y la homeostasis vascular. La endotelina además de ser un vasoconstrictor, promueve la proliferación de células musculares lisas y la secreción de la matriz extracelular (Velasco y Hernández, 2001).

3.2.2 Disfunción endotelial.

El endotelio normal funciona de manera inhibidora, manteniendo relajado el tono vascular e inhibiendo el crecimiento del músculo liso, la adhesión y agregación plaquetaria y la trombosis. Es fácil comprender que una alteración de la función endotelial trae como consecuencia una respuesta vasoconstrictora con el aumento de la resistencia vascular periférica y la elevación de la presión arterial. El término disfunción endotelial se refiere a una anormalidad general de las funciones que realiza el endotelio. La disfunción es ampliamente reconocida como un evento temprano en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. La lesión endotelial provoca áreas de pérdida de las células endoteliales, sustitución del tejido endotelial por fibrina y necrosis de las células musculares lisas. La exposición del endotelio y los componentes de la media del vaso a la corriente sanguínea, conducen a la activación del sistema hemostático. El deterioro en la vasodilatación, mediado por el endotelio puede estar causado por una disminución de la producción del NO o una disminución de la respuesta al mismo en el músculo liso vascular. La Ang II puede ser en parte responsable de la disfunción endotelial porque induce resistencia a la acción vasodilatadora del NO (Velasco y Hernández, 2001).

3.3 CONTROL RENAL DE LA PRESIÓN ARTERIAL.

El riñón tiene un papel muy importante en la regulación de la hipertensión arterial sistémica. Lo lleva a cabo a través de un mecanismo basado en mantener la homeostasis hidroelectrolítica, es decir en establecer un equilibrio en el volumen de fluido extracelular y las concentraciones principalmente de sodio y otros electrolitos. Existe una relación directa entre modificaciones de los niveles de presión arterial y cambios en excreción renal de agua (diuresis) y de sodio (natriuresis). Una elevación en la presión de perfusión de la arteria aferente renal como consecuencia de un aumento en la resistencia periférica, resulta en un rápido incremento de la excreción de sodio y agua en el riñón (Guyton y Hall, 2006).

Otro mecanismo de regulación renal de la presión arterial es el sistema renina-angiotensina, cuyo fino control permite obtener gradientes de presión necesarios para cada una de las zonas renales y sus funciones de filtración, reabsorción y eliminación (Guyton y Hall, 2006).

3.4 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA RENAL.

3.4.1 Anatomía renal.

Los riñones son órganos pares con forma de haba, ubicados en el retroperitoneo, sobre la pared abdominal posterior. Cada riñón humano pesa aproximadamente 150 g. El riñón está rodeado por una delgada cápsula de tejido conectivo de colágeno que, por lo general, está poco adherido y se elimina con facilidad (Geneser, 2000).

Si se corta un riñón de manera longitudinal (Fig. 2), se observa el parénquima renal, que está compuesto por una corteza y una médula. La corteza presenta un aspecto rojo oscuro, granulado y rodea por completo a la médula y envía prolongaciones, las columnas renales, a través de toda la profundidad de la médula. La médula tiene casi el doble de espesor que la corteza y se compone de estructuras más claras que por su forma se conocen como pirámides renales, separadas por columnas renales. Las bases de las pirámides están orientadas hacia la corteza, mientras que las puntas o papilas renales se ubican cada una en un cáliz menor, con forma de embudo. Las pirámides presentan un estriado característico desde la base a la papila (Geneser, 2000).

El riñón se divide en lóbulos, cada uno formado por una pirámide renal y la sustancia cortical que la rodea. Desde cada base de la pirámide irradian hacia la corteza delgadas estriaciones paralelas de sustancia similar a la medular, los rayos medulares.

La unidad funcional renal está conformada por la nefrona y los tubos colectores correspondientes. Por lo tanto, las nefronas y los tubos colectores representan el parénquima renal y están densamente empaquetados, sólo separados por escasa cantidad de tejido conectivo intersticial, en el que se distribuyen vasos sanguíneos, vías linfáticas y nervios (Geneser, 2000).

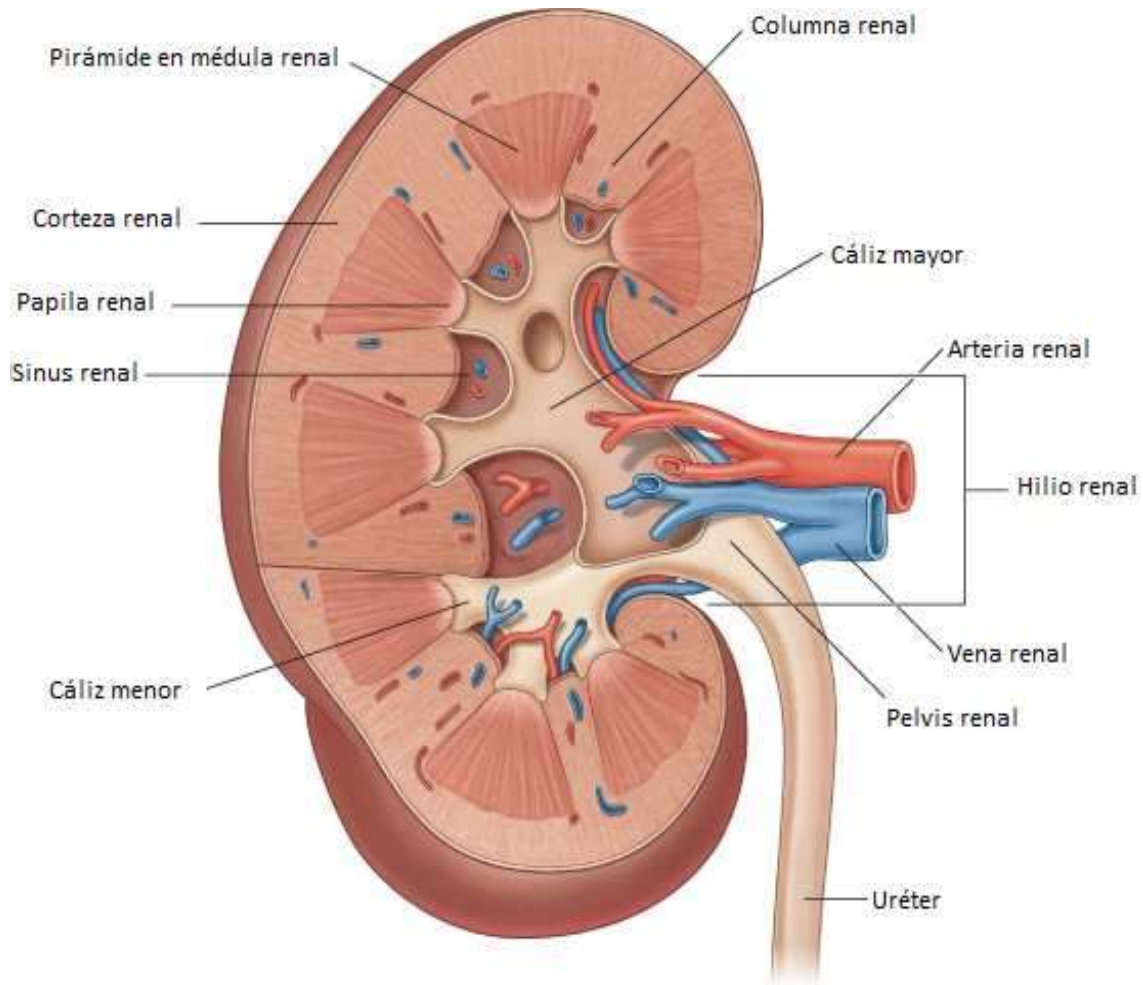


Figura.2. **Anatomía renal.** Corte longitudinal en el que se muestran las principales estructuras renales. Modificado de Guyton y Hall 2006.

NEFRONA. Cada nefrona comienza con un extremo ciego ensanchado, invaginado por un ovillo capilar, por lo que se forma una pequeña estructura redondeada, denominada corpúsculo renal. Desde allí parte una porción tubular, que se puede dividir en varios sectores sucesivos con distinta estructura y función. La primera porción se denomina túbulo proximal y presenta una parte sinuosa (túbulo contorneado proximal), y una parte recta, que se comunica con la parte recta del túbulo distal a través de un segmento delgado. Este continúa con una parte sinuosa (túbulo contorneado distal), después de atravesar la región de la mácula densa. Las distintas partes de la nefrona, tienen una localización determinada en el riñón. El

corpúsculo renal y la parte contorneada de los túbulos proximales y distales se encuentran en la corteza. La parte recta del túbulo proximal, el segmento delgado y la parte recta del túbulo distal conforman el asa de Henle, que se inserta durante un trecho variable en el interior de la médula, donde forma un asa en hebilla (Fig. 4). (Geneser, 2000).

En el riñón existen dos tipos de nefronas: las nefronas corticales y las nefronas yuxtamedulares. Los corpúsculos renales de las nefronas corticales se localizan en la parte externa de la corteza. Presentan un asa de Henle corta, que recorre a sólo una pequeña porción dentro de la médula, y un segmento delgado corto o ausente. Los corpúsculos renales de las nefronas yuxtamedulares se localizan en la parte profunda de la corteza, cerca de la médula. Poseen un asa de Henle larga, que se extiende hasta el interior de la papila, y un segmento delgado largo (Fig. 3). (Geneser, 2000).

Las nefronas se vacían en tubos colectores, que llegan al área cribosa de la papila después de atravesar los rayos y las pirámides medulares, con frecuentes fusiones a tubos más grandes (Fig. 4). (Geneser, 2000).

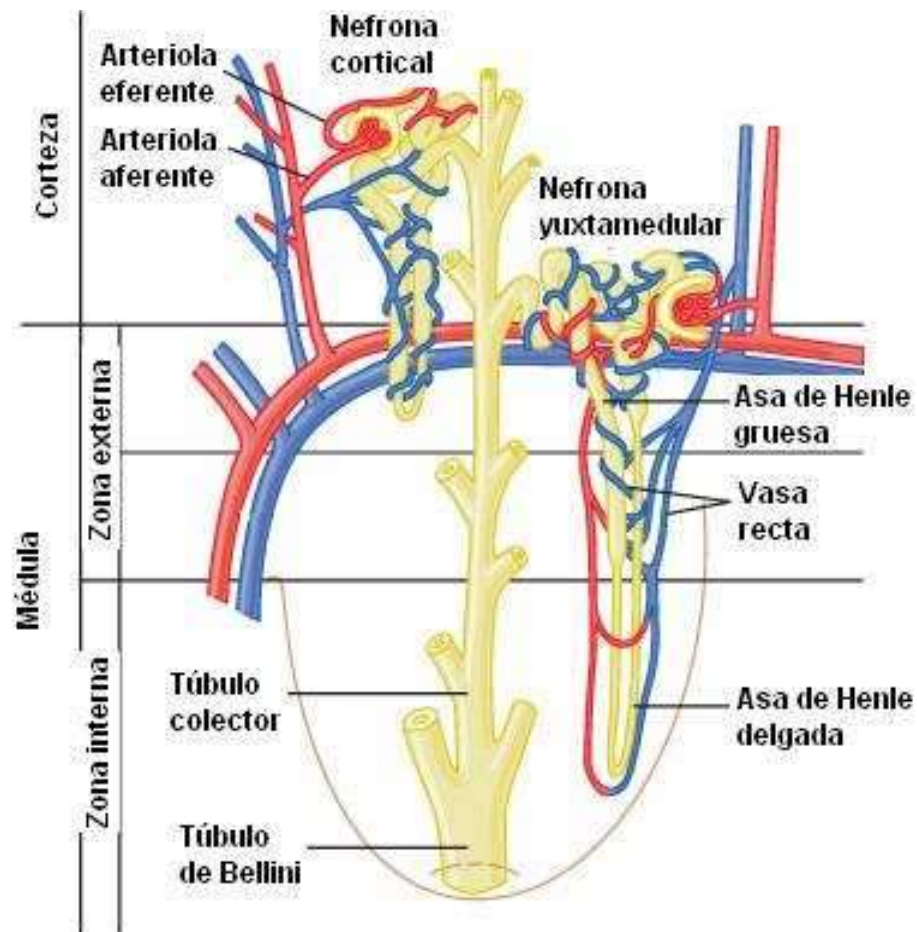


Figura. 3. **Estructuras de la corteza y médula renales.** Muestra los dos tipos de nefronas, su localización y sus principales estructuras. Modificado de Guyton *et al* 2006.

CORPÚSCULO RENAL. Los corpúsculos renales se encuentran sólo en la corteza y a ellos se debe el aspecto granular que se observa en los cortes frescos. Cada corpúsculo se compone de un ovillo capilar o glomérulo, rodeado por una cápsula de dos capas, la cápsula de Bowman (a menudo se utiliza la denominación glomérulo para designar todo el corpúsculo renal). La capa externa de la cápsula, o capa parietal, forma el límite exterior del corpúsculo. La cara interna, o capa visceral, recubre exactamente los capilares del glomérulo. El espacio entre las dos capas se denomina espacio urinario. El proceso de filtración, con producción de un ultrafiltrado de la sangre, tiene lugar desde los capilares del glomérulo, a través de sus paredes y

la capa de epitelio visceral, y hacia el espacio urinario. En uno de los polos del corpúsculo renal (el polo urinario), el espacio capsular se comunica con la luz del túbulo proximal, dado que allí la capa epitelial parietal se transforma en epitelio tubular. Así, el ultrafiltrado pasa desde el espacio capsular al túbulo proximal. Opuesto al polo urinario se encuentra el polo vascular, al que ingresa una arteriola aferente y egresa una arteriola eferente. La arteriola aferente se divide dentro del corpúsculo renal en unas cinco ramas, cada una de las cuales forma un cúmulo de asas capilares anastomosadas o lobulillo. Los capilares de todos los lobulillos se unen en una arteriola eferente, que abandona el corpúsculo renal hacia el polo vascular (Fig. 4). (Geneser, 2000).

APARATO YUXTAGLOMERULAR. El aparato yuxtaglomerular está íntimamente adosado al glomérulo en el punto por donde penetra la arteria aferente (Fig. 4). El aparato yuxtaglomerular consta de: 1) Las células yuxtaglomerulares, células musculares lisas granulares y modificadas de la capa media de la arteriola aferente que contienen renina; 2) La mácula densa, una región especializada de la porción del túbulo distal que regresa hacia el polo vascular del glomérulo al que pertenece, donde las células tubulares están más apiñadas, son algo más cortas y muestran patrones específicos de interdigitación entre las membranas adyacentes, y 3) Las células no granulosas o "lacis", que se encuentran en la zona limitada por la arteriola aferente, la mácula densa y el glomérulo. El aparato yuxtaglomerular es un órgano endocrino en miniatura, siendo las células yuxtaglomerulares la principal fuente de producción de renina por el riñón. El citoplasma de las células yuxtaglomerulares presenta gránulos que contienen la enzima renina o su precursor (Robbins, 2006).

En el mecanismo de liberación de renina intervienen varios elementos. A través del mecanismo barorreceptor, las células yuxtaglomerulares actúan como receptores de estiramiento, que reaccionan ante un aumento de la presión arterial y la consecuente presión intravascular en la arteriola aferente. Esto inhibe la liberación de renina. También interviene el mecanismo de la mácula densa, que regula la secreción de renina de acuerdo con la composición del líquido tubular en el túbulo distal, por lo

que la disminución de la concentración de sodio implica un aumento de la liberación de renina. Además, el incremento de la cantidad de líquido en el túbulo distal produce la expansión de éste último, lo cual inhibe la secreción de renina por las células de la mácula densa. Otros factores tienen acción sobre la secreción de renina, entre ellos, la innervación simpática, que estimula la secreción de renina (Geneser, 2000).

VASOS SANGUÍNEOS. El riñón está altamente vascularizado (Fig. 4), y recibe el 25% del gasto cardíaco. La corteza es la parte más vascularizada del riñón, recibiendo el 90% de la sangre total que le llega. La arteria renal principal se bifurca en dos ramas, anterior y posterior. De ellas parten las arterias interlobulares, que discurren entre los lóbulos y dan lugar a las arterias arcuatas, que forman arcos entre la corteza y la médula y dan origen a las arterias interlobulillares. Desde las arterias interlobulillares, las arteriolas aferentes entran en el ovillo glomerular, donde progresivamente se subdividen en 20 a 40 asas capilares dispuestas en varias unidades o lóbulos arquitectónicamente centrados por un eje mesangial que los soporta. Las asas capilares confluyen para salir del glomérulo como arteriolas eferentes. En general, las arteriolas eferentes de las nefronas superficiales forman una rica red vascular que rodea a los túbulos corticales (red vascular peritubular), mientras que más profundamente los glomérulos yuxtamedulares dan lugar a los vasa recta, que descienden directamente para irrigar las zonas interna y externa de la médula. Después los vasa recta arteriales descendentes forman varias asas en la parte más interna de la médula y ascienden como vasa recta venosos (Robbins, 2006).

GLOMÉRULOS. Los glomérulos están formados por una red anastomosada de capilares revestidos por un endotelio fenestrado dotado de dos envolturas epiteliales. El epitelio visceral se incorpora a la pared capilar y se convierte en parte intrínseca de la misma, quedando separado de las células endoteliales por una membrana basal. El epitelio parietal, situado en la cápsula de Bowman, reviste el espacio urinario, cavidad donde se recoge inicialmente el filtrado del plasma (Robbins, 2006).

La membrana de los capilares glomerulares actúa como filtro y consta de las siguientes estructuras:

- Una fina capa de células endoteliales fenestradas, con poros de aproximadamente 70 a 100nm de diámetro.
- Una membrana basal glomerular (MBG) con una gruesa capa central, la lámina densa, y unas capas periféricas más finas, la lámina interna y la lámina externa. La MBG está formada por colágeno (principalmente de tipo IV), laminina, proteoglucanos polianiónicos, fibronectina, entactina y otras glucoproteínas. El colágeno forma una supraestructura en forma de red a la que se unen otras glucoproteínas.
- Las células epiteliales viscerales (podocitos) son células estructuralmente complejas dotadas de expansiones digitiformes adherentes e incrustadas en la lámina rara externa de la membrana basal. Las prolongaciones podálicas (pedicelios) adyacentes están separadas por poros de filtración de 20 a 30nm de ancho, unidos entre sí por un fino diafragma en forma de puente.
- Todo el penacho u ovillo glomerular descansa sobre las células mesangiales situadas entre los capilares. Estas células, de origen mesenquimal, son contráctiles, fagocíticas y capaces de proliferar, de depositar matriz y colágeno, y de secretar varios mediadores biológicamente activos. Biológicamente, en su mayoría son semejantes a las células vasculares de músculo liso (Robbins, 2006).

Las principales características de la filtración glomerular normal son una extraordinaria permeabilidad al agua y solutos de pequeño tamaño, debido a la naturaleza altamente fenestrada del endotelio, e impermeabilidad a proteínas tales como moléculas del tamaño de la albúmina (3.6 nm de radio; 70 kDa de peso molecular) o mayores. Esta última propiedad, llamada función de barrera glomerular, discrimina entre varias moléculas proteicas, dependiendo de su tamaño (a mayor tamaño, menor permeabilidad) y carga (cuanto más catiónicas, más permeables). El

diafragma poroso de los podocitos ofrecen una barrera de difusión distal tamaño selectiva para la filtración de proteínas, y es la principal responsable de la síntesis de los componentes de la MBG (Robbins, 2006).

TÚBULOS. La estructura de las células epiteliales de los túbulos renales varía considerablemente según los distintos segmentos de la nefrona y, hasta cierto punto, guarda relación con su función. Por ejemplo, la estructura muy evolucionada de las células del túbulo proximal, con sus abundantes y largas microvellosidades, numerosas mitocondrias, canalículos apicales y sus extensas interdigitaciones intercelulares, se correlaciona con sus principales funciones: la reabsorción de dos tercios del agua y el sodio filtrados, así como de la glucosa, potasio, fosfato, aminoácidos y proteínas (Robbins, 2006).

INTERSTICIO. En la corteza renal normal, el espacio intersticial es compacto, y está ocupado por los capilares peritubulares fenestrados y un pequeño número de células parecidas a los fibroblastos. Cualquier aumento evidente del intersticio cortical suele ser anormal (Robbins, 2006).

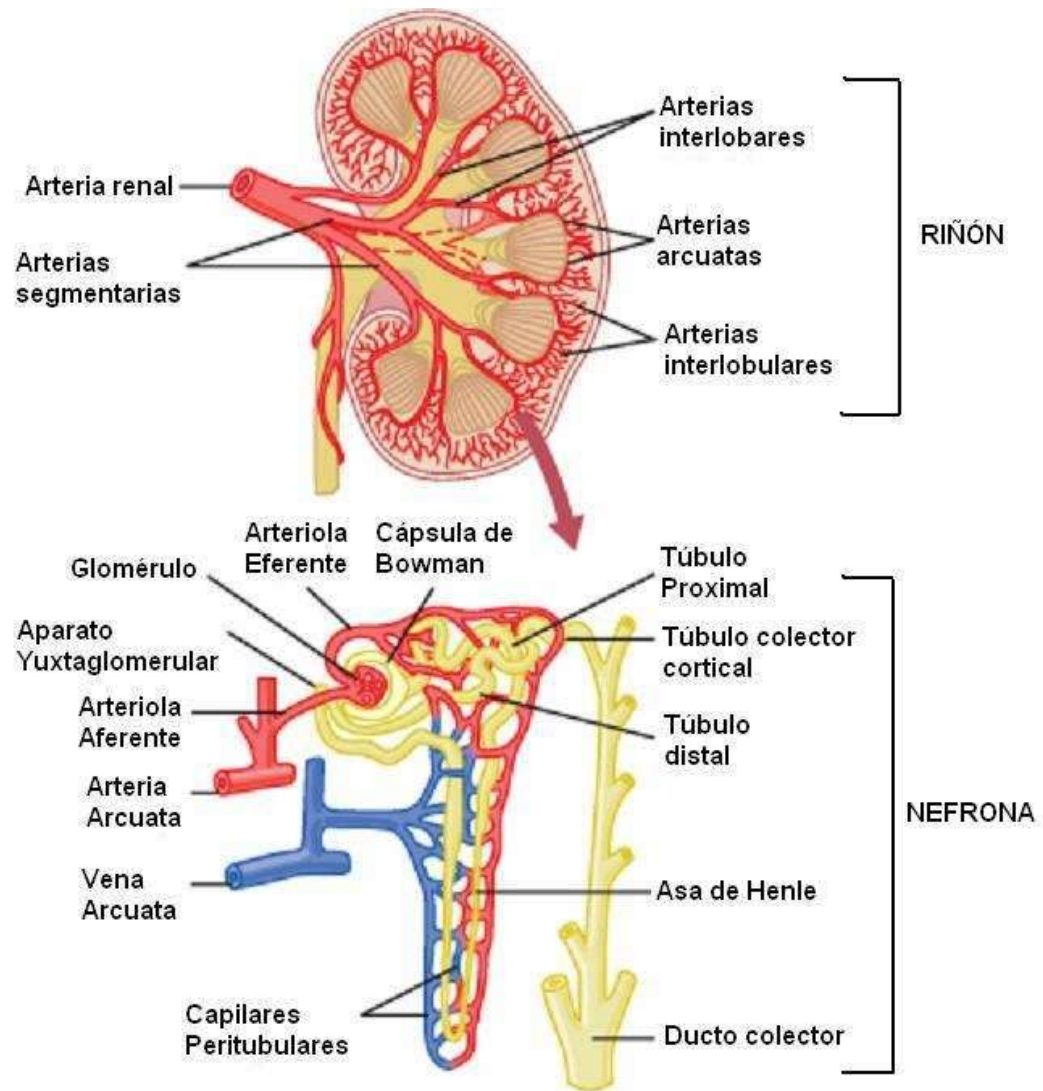


Figura.4. **Irrigación renal y estructuras de la nefrona.** Muestra en la parte superior la distribución arterial en el riñón completo y en la parte inferior las partes de la nefrona y su irrigación. Modificado de Guyton y Hall 2006.

3.4.2 Fisiología renal.

La formación de la orina, función central de la nefrona, comienza con la producción de un ultrafiltrado del plasma que luego se modifica a través de procesos de

reabsorción y secreción, finalizando con la excreción a través de los túbulos colectores que vacían su contenido en la vejiga urinaria. Estos procesos permiten mantener el volumen y la composición de los líquidos corporales dentro de los estrechos límites fisiológicos (Best y Taylor, 2003).

El filtrado glomerular (FG) es la suma del filtrado que realizan cada una de las nefronas funcionales, por lo que es el índice más cercano a la evaluación global del funcionamiento renal. Los glomérulos son las estructuras encargadas de la producción de un ultrafiltrado del plasma (plasma libre de proteínas) y adquieren esa propiedad en la vida fetal. El volumen de filtrado glomerular (VFG) es de 125ml/min o 180L/día. El ultrafiltrado se rige por el equilibrio entre la presión hidrostática del líquido intracelular y la presión oncótica de las proteínas del plasma, y se mantiene debido a un fenómeno conocido como “autorregulación” (Best y Taylor, 2003).

AUTORREGULACIÓN.

La capacidad de mantener un flujo constante a pesar de los cambios en la presión arterial sistémica es lo que se conoce como autorregulación. Existen dos mecanismos para llevar a cabo esta regulación, el primero se refiere al llamado mecanismo miogénico, una propiedad intrínseca del músculo liso vascular, que permite la contracción del músculo cuando se estira, es decir, en respuesta a un aumento en la tensión de la pared arterial (en general debido a aumentos en la presión arterial). El radio de la arteriola aferente disminuiría debido a la contracción, en respuesta a aumentos de la presión de perfusión. Un mecanismo alternativo es la retroalimentación glomerotubular, a través del que puede censarse el flujo del líquido tubular (o algún componente de él, como el nivel de reabsorción de NaCl) y traducirse en el grado de resistencia de la arteriola. El sensor se ubica en la mácula densa del aparato yuxtaglomerular (AYG) y responde en señal del estímulo, para afectar tanto la resistencia de la arteriola aferente como el filtrado glomerular. Cuando el filtrado glomerular aumenta el flujo a la mácula densa, el AYG envía una señal, causa vasoconstricción y retorna el flujo sanguíneo renal y el filtrado

glomerular a valores normales. En contrapartida cuando el filtrado glomerular y el flujo sanguíneo renal decrecen, la mácula densa enviará una señal que provocará un aumento tanto del filtrado como del flujo (Best y Taylor, 2003).

La composición del FG está determinada por la barrera de filtración glomerular que está compuesta por el endotelio del capilar glomerular, la membrana basal y las hendiduras que dejan los podocitos (Best y Taylor, 2003).

La regulación de la presión hidrostática del capilar glomerular (PHCG) que promueve el movimiento de los líquidos hacia el espacio de Bowman, se basa sobre todo en cambios en la resistencia de las arteriolas aferentes y eferentes, que es influida por modificaciones de la presión arterial sistémica. Las respuestas a los cambios anteriormente descritos, se ilustran a continuación:

- Cambios en la presión de la arteria renal: un aumento en la tensión arterial incrementa en forma transitoria la PHCG y en consecuencia el filtrado glomerular (FG) y un descenso de la tensión arterial causa una disminución del filtrado.
- Cambios en la resistencia de la arteriola aferente: una caída en la resistencia de esa arteriola, aumenta la PHCG, por lo tanto, aumenta el FG; en tanto que una disminución de la resistencia causa el efecto contrario.
- Cambios en la resistencia de la arteriola eferente: una disminución en la resistencia de esa arteriola produce una disminución de la PHCG, y por lo tanto una reducción del FG (Best y Taylor, 2003).

Los riñones son órganos metabólicamente activos, pero el gran requerimiento sanguíneo no es en primer término para la oxigenación tisular, sino para mantener un nivel adecuado de filtrado glomerular. El flujo sanguíneo renal (FSR) está determinado por la diferencia de presión arteriovenosa a través del lecho vascular (la presión de perfusión) y por la resistencia vascular. La presión en la arteria renal es en esencia la misma que en las arterias sistémicas, y promedian los 100 mm Hg. La

gran caída de presión que se produce en las arteriolas aferentes y eferentes identifica estos vasos como los sitios principales de resistencia vascular renal. Los cambios en los diámetros de estos vasos constituyen el mecanismo primario de ajuste de la resistencia vascular renal y son el determinante principal del volumen de filtración glomerular (Best y Taylor, 2003).

Las arteriolas aferentes y eferentes responden a cambios de la presión de perfusión, a la estimulación nerviosa y la exposición de hormonas y fármacos. En la mayoría de los casos el tono vascular de ambas arteriolas se regula para asegurar una presión de filtración adecuada. Un aumento en la presión sistémica podría dañar las paredes delicadas de los capilares glomerulares o incrementar en exceso el flujo sanguíneo y en consecuencia, el nivel de FG. Para prevenirlo, la arteriola aferente se contrae y modula así la presión y el flujo sanguíneo de los capilares. Por el contrario, si la presión sistémica cae, la arteriola aferente se dilata para permitir un flujo sanguíneo adecuado a los capilares glomerulares; también se contrae en respuesta a la hipotensión, lo que ayuda a mantener una presión apropiada en el lecho capilar (Best y Taylor 2003).

Las principales sustancias que influyen en el flujo plasmático renal y en el volumen de filtración glomerular son:

LA ANGIOTENSINA II (Ang II). Esta sustancia desempeña una participación primordial en la regulación del FPR y el VFG. Se produce como respuesta a la secreción de renina por parte de las células granulares y actúa tanto en forma local (dentro del parénquima renal), como sistémica; además se produce en diferentes tejidos donde posee acción paracrina. La Ang II eleva la presión sanguínea, produce vasoconstricción arteriolar renal aferente y eferente, y disminuye el FSR y el FG. La arteriola eferente es más sensible a la Ang II que la aferente. A bajas concentraciones de Ang II, predomina la contracción de la arteriola eferente (donde un aumento del tono de esa arteriola tiende a aumentar el VFG), pero a altas concentraciones se produce la contracción de ambos vasos. La vasoconstricción

aferente se realiza por medio del ingreso de calcio por la activación de canales lentos del mismo y en general aumenta la vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático a través de los receptores adrenérgicos α_1 . En cambio, la vasoconstricción eferente involucra la liberación del calcio de sus reservas intracelulares; estas diferencias podrían explicar la diferencia en la sensibilidad a la Ang II en ambos vasos. Los receptores glomerulares para la Ang II se encuentran en las células endoteliales y en los podocitos, donde se ejerce una contracción potente de las células mesangiales que hace disminuir el coeficiente de filtración que es un índice de la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular. Los efectos de la Ang II en el nivel glomerular son contrarrestados por el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas (PG), de hecho la síntesis y la liberación de PG son estimuladas por la Ang II. En determinadas situaciones patológicas renales, la Ang II se encuentra en concentraciones más elevadas y ejerce un potente efecto sobre la hemodinamia renal (Best y Taylor, 2003).

ÓXIDO NÍTRICO (NO). Es un factor relajante del endotelio, por lo tanto, tiene un efecto vasodilatador en condiciones basales y contrarresta los efectos constrictores de la Ang II y las catecolaminas. Las células endoteliales liberan NO ante aumentos en la fricción contra las paredes, acetilcolina e histamina, produciendo vasodilatación de las arterias aferente y eferente. La inhibición de su síntesis, por distintos mediadores o por estados de disfunción endotelial, se relaciona con hipertensión arterial. El exceso de producción de NO aumenta la PHCG debido a la vasodilatación de la arteriola aferente y es uno de los responsables del hiperfiltrado glomerular, un fenómeno temprano en el daño glomerular (Best y Taylor, 2003).

PROSTAGLANDINAS (PG). Son derivados del ácido araquidónico y se sintetizan localmente en el parénquima renal ante situaciones patológicas. Actúan localmente sin cambiar el filtrado glomerular. Antagonizan los efectos del sistema nervioso simpático y de la Ang II, previniendo así el daño de la vasoconstricción y la consecuente isquemia renal (Velasco y Hernández, 2001).

FUNCIÓN TUBULAR. La formación de la orina requiere tres procesos básicos: la filtración del plasma por el glomérulo, la reabsorción de agua y solutos desde el ultrafiltrado y la secreción de sustancias al líquido tubular (Fig. 5). Los procesos de reabsorción y secreción, que se llevan a cabo en los túbulos renales, determinan la composición de la orina, por lo que la función tubular regula con precisión el volumen, la osmolaridad, la composición y el pH tanto del compartimiento intracelular como de los compartimentos extracelulares renales (Best y Taylor, 2003).

La secreción tubular es el proceso mediante el cual una sustancia presente en la sangre se transporta a través del epitelio tubular hacia la luz del túbulo. Es importante diferenciar este proceso de la excreción tubular, que es el proceso mediante el cual el riñón determina la composición final de la orina (una sustancia puede filtrarse, reabsorberse y no excretarse) (Best y Taylor, 2003).

Los movimientos de solutos se producen tanto por mecanismos pasivos como activos. El agua lo hace por mecanismos pasivos principalmente. Estos intercambios respetan tres tipos de equilibrios:

Equilibrio químico: los solutos se mueven entre los compartimentos siguiendo su gradiente de concentración.

Equilibrio osmótico: el agua se mueve siguiendo su gradiente de concentración, recordando que la osmolaridad se relaciona con el número de partículas en solución y no con su masa.

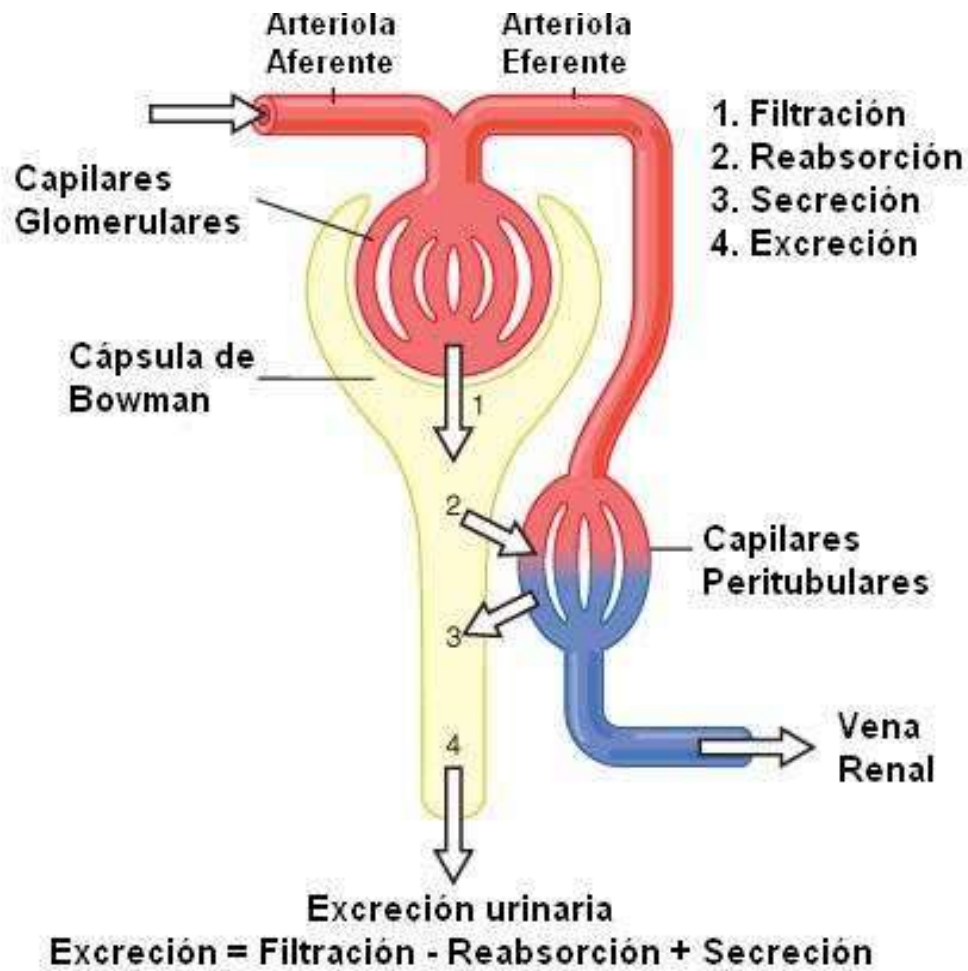


Figura. 5. **Fisiología renal.** Muestra las diversas funciones renales y el área donde se llevan a cabo en la nefrona. Modificado de Guyton *et al* 2006.

3.5 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

El sistema renina-angiotensina está compuesto por hormonas que interaccionan entre sí. Son secretadas por el riñón y la corteza adrenal y actúan en la regulación del balance de sodio y de potasio, el mantenimiento del volumen del líquido extracelular y la regulación de la presión arterial tanto a corto como a largo plazo (Pascuzzo, 2008).

Los componentes del sistema renina-angiotensina clásico son: la enzima renina, la enzima convertidora de angiotensina, los péptidos angiotensinógeno, angiotensina I y angiotensina II y los receptores AT1 y AT2 (Fig. 6). (Pascuzzo, 2008, Goodman y Gilman 2006).

El sistema comienza con la liberación del péptido angiotensinógeno por parte del hígado hacia la circulación general, a continuación se activa la enzima renina en las células yuxtaglomerulares renales para que se lleve a cabo la conversión del angiotensinógeno al péptido Angiotensina I (Ang I). Posteriormente la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se produce en el pulmón y es la encargada de la conversión de Ang I en Ang II, que a su vez interacciona con el receptor a angiotensina AT1 provocando vasoconstricción (Goodman y Gilman 2006).

SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

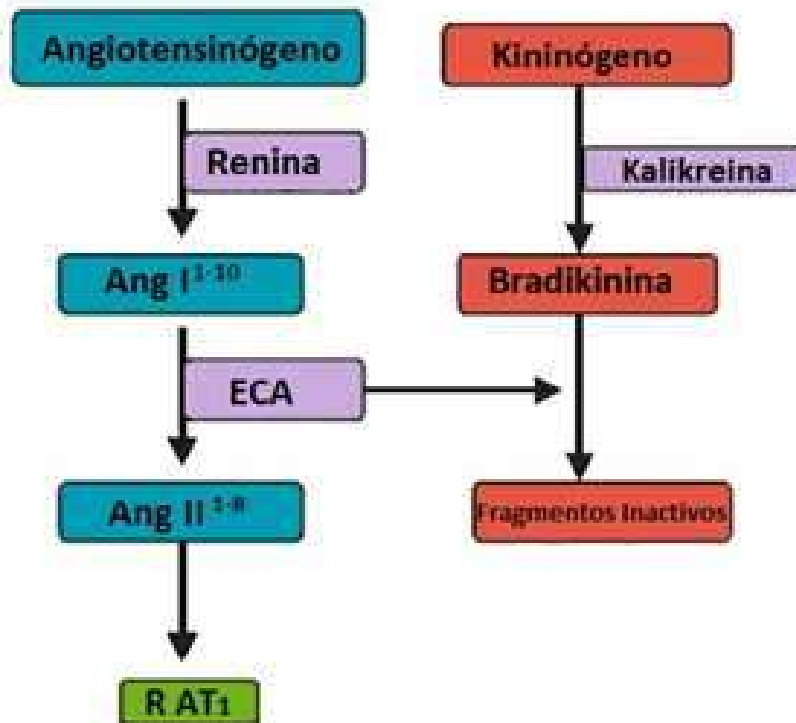


Figura.6. **Vía clásica del sistema renina angiotensina.** Se muestran los componentes del sistema. ECA, enzima convertidora de angiotensina; AT₁, receptor tipo 1 a la angiotensina II.

El sistema renina-angiotensina además de ser regulado por los estímulos celulares, tiene otros mecanismos intrínsecos para modular su función. Uno de ellos consiste en una retroalimentación negativa por sustrato, donde un exceso de Ang II puede inhibir la activación y liberación de renina en el riñón. El otro mecanismo es a través de la internalización de receptores después de la sobreestimulación de los mismos (Goodman y Gilman 2006).

A continuación se describen las características más importantes de los componentes del sistema renina-angiotensina.

RENINA. La renina es una aspartil proteasa. Su principal sustrato es el angiotensinógeno, donde rompe el enlace entre los residuos 10 y 11 en el amino terminal de esta proteína para generar angiotensina I. La forma activa de renina es un glucoproteína que contiene 340 aminoácidos. Se sintetiza como preproenzima de 406 aminoácidos que se procesan a prorrenina, una forma madura pero inactiva de la proteína. La prorrenina es activada finalmente por una enzima todavía no caracterizada que elimina 43 aminoácidos del amino terminal de la prorrenina.

Es sintetizada, almacenada y secretada hacia la circulación renal por las células yuxtaglomerulares granulares que yacen en las paredes de las arteriolas eferentes conforme entran en los glomérulos (Goodman y Gilman 2006).

La secreción de renina a partir de las células yuxtaglomerulares es controlada de por tres vías; dos que actúan a nivel local dentro de los riñones, y una tercera que funciona en todo el sistema nervioso central (SNC) y que está mediada por la liberación de noradrenalina a partir de nervios noradrenérgicos renales (Goodman y Gilman 2006).

- El primer mecanismo intrarrenal se denomina vía de la mácula densa. Esta estructura es muy sensible a cambios en la velocidad de liberación de sodio y cloruro al túbulo distal. La disminución en el flujo de NaCl a través de la mácula densa estimula la secreción de renina y viceversa.
- El segundo mecanismo intrarrenal se denomina, vía del barorreceptor intrarrenal. Este mecanismo involucra un receptor vascular renal, que se localiza en la arteriola aferente, el cual funciona como un receptor de tensión o estiramiento. Una reducción en el estiramiento de los vasos preglomerulares, como consecuencia de una disminución en la presión arterial, promueve la secreción de renina y viceversa.
- El tercer mecanismo se denomina, vía del receptor β -adrenérgico. Está mediado por la liberación de noradrenalina a partir de las terminales nerviosas simpáticas postganglionares. La activación de los β_1 -adrenoreceptores sobre

las células yuxtaglomerulares aumenta la secreción de renina (Goodman y Gilman 2006).

Otro mecanismo de regulación de la secreción de renina, es a través de la acción directa de la Ang II sobre las células yuxtaglomerulares. Esta inhibición, constituye la base de un mecanismo de retroalimentación negativa de ciclo corto que controla la liberación de renina (Pascuzzo, 2008, Goodman y Gilman 2006).

ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ECA). Es una enzima de tipo carboxipeptidasa. La ECA humana contiene 1278 aminoácidos y presenta dos dominios homólogos, cada uno con un sitio catalítico y una región de unión al Zn^{+2} . Esta enzima se encuentra unida en la membrana de la cara luminal de células endoteliales de todo el sistema cardiovascular. Es la encargada de la conversión del decapeptido Angiotensina I al octapéptido Angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor. Otro de los sustratos de dicha enzima es la bradicinina, sobre la cual actúa inactivándola (Velasco y Hernández, 2001).

ANGIOTENSINA II: es un octapéptido con potente efecto vasoconstrictor, media su efecto principalmente a través de su interacción con el receptor AT1. Se sabe que como efecto predominante, el péptido angiotensina II produce vasoconstricción en las células del músculo liso vascular (Velasco y Hernández, 2001). También se ha demostrado su influencia en los procesos de angiogénesis, como promotor de la hipertrofia cardíaca y como un factor determinante en el desarrollo de la disfunción endotelial, entre otros (Kim e Iwao, 2000).

RECEPTOR AT1. La principal acción de la angiotensina II es la vasoconstricción y ésta es mediada directamente a través del acoplamiento del receptor AT1, con una vía dependiente de la activación de proteínas G. Dicha vía comienza con la unión de la angiotensina II al receptor AT1, lo cual promueve un cambio conformacional en el receptor, que le permite interactuar con la proteína G_q , la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), que a su vez promueve la hidrólisis de fosfolípidos de membrana (PIP_2) produciendo diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP_3), que a su vez promueve la

movilización de calcio a través de la estimulación de receptores específicos en el retículo sarcoplásmico (de Gasparo *et al.*, 2000).

3.6 ÓXIDO NÍTRICO Y MODELO DE HIPERTENSIÓN INDUCIDA CON L-NAME.

- ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico es una molécula de bajo peso molecular (30 Da), en estado gaseoso, lo que la hace altamente difusible. El óxido nítrico se sintetiza a través de la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidino de la L-Arginina; es producido en dos pasos de reacción. Primero se lleva a cabo la oxidación de dos electrones provistos por el NADPH generando el intermediario N^G-hidroxi-L-arginina, enseguida se da una oxidación de tres electrones del nitrógeno hidroxilado para finalmente producir L-citrulina y óxido nítrico; ambos pasos de reacción son dependientes de oxígeno y NADPH (Fig. 7) (Stuehr *et al.*, 2004).

Esta reacción es catalizada por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS). A la fecha se conocen 4 isoenzimas: la nNOS (neuronal), la eNOS (endotelial), la iNOS (inducible) y la mtNOS (mitocondrial) (Palmer *et al.*, 1988).

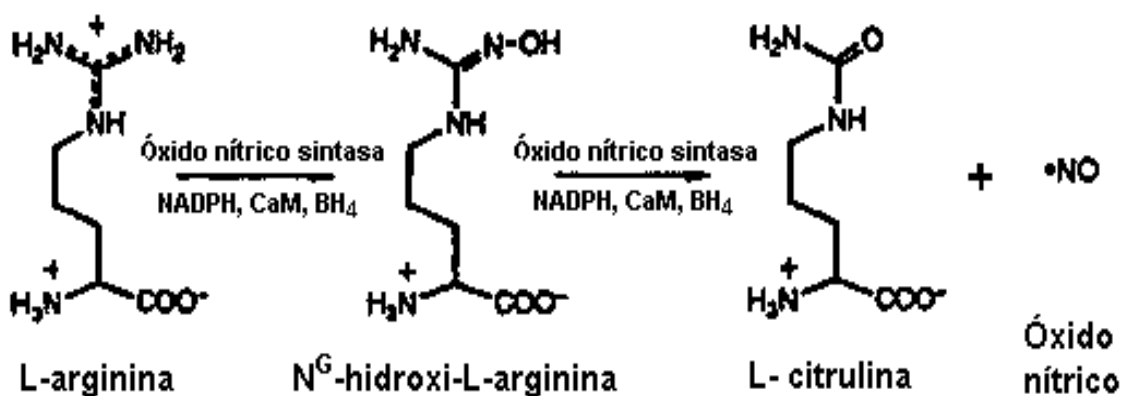


Figura.7. Síntesis del óxido nítrico. Se ilustra la reacción de producción del óxido nítrico y los cofactores necesarios para la catálisis. CaM= calmodulina, BH₄ = Tetrahidrobiopterina. Modificado de Stuehr *et al.*, 2004.

El óxido nítrico desempeña un papel muy importante en el sistema cardiovascular debido a su función como vasodilatador. Además, mantiene la integridad vascular a través de inhibir la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos en el endotelio,

y la proliferación del músculo liso vascular. La mayor parte del óxido nítrico vascular se sintetiza en las células endoteliales, sin embargo, también es producido en el músculo liso cardíaco donde se encarga de regular la contractilidad cardíaca (Liu y Huang, 2008).

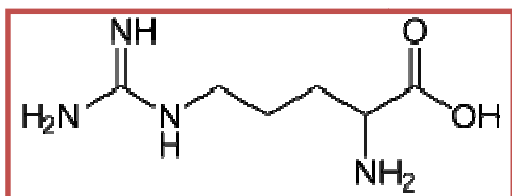
Si por alguna causa patológica disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico, se promueve la disfunción endotelial (Liu y Huang, 2008).

La disminución de la producción de NO puede ser atribuida a:

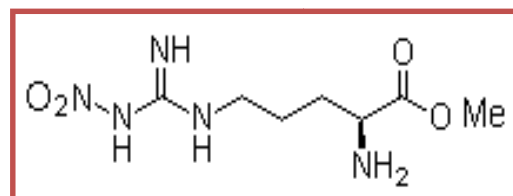
1. Alteración de la disponibilidad intracelular de L-arginina.
 2. Disminución de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa.
 3. Alteración de la liberación de NO mediada por receptores en respuesta a estímulos farmacológicos.
 4. El aumento de la degradación del NO deriva del incremento de radicales libres de oxígeno en el endotelio y/o en el músculo liso vascular (Velasco y Hernández, 2001, Zhang *et al.*, 2011).
- MODELO DE HIPERTENSIÓN INDUCIDA CON L-NAME.

Siendo tan importante el óxido nítrico tanto en la regulación de los niveles de presión arterial como en el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular en general, se obtuvo un modelo de hipertensión inducida con la administración de L-NAME que produce una inhibición en la producción del óxido nítrico.

El L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina metilester) es un inhibidor competitivo no selectivo de las enzimas óxido nítrico sintasas, debido a su gran parecido con la L-Arginina (sustrato fisiológico de las enzimas) (Fig. 8). Su administración, genera un aumento en los niveles de presión arterial sistémica, vasoconstricción renal importante y produce disfunción endotelial por inhibición de la producción de óxido nítrico. También se ha descrito que produce modificaciones histológicas en los vasos sanguíneos, el riñón y el corazón. Su efecto es dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento (Ribeiro *et al.*, 1992; Baylis *et al.*, 1992; Zatz y Baylis, 1998 y Török 2008).



L- Arginina



N^ω-nitro-L-arginina metilester

Figura. 8. Comparación estructural del sustrato fisiológico y el inhibidor de las óxido nítrico sintasas L-NAME.

3.7 TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA.

Actualmente, en el tratamiento de la hipertensión se han empleado distintos blancos terapéuticos entre los que destacan: los canales de calcio de tipo L, los receptores adrenérgicos, el péptido angiotensina II, los receptores AT1, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), entre otros. Los blancos descritos anteriormente están involucrados en la regulación del sistema renina-angiotensina (SRA), que a su vez se ha considerado como uno de los más importantes en el desarrollo y establecimiento de la hipertensión (Zicha y Kunes, 1999).

El captopril es un inhibidor competitivo de la ECA, actúa bloqueando el sitio activo de la enzima, de esta manera evita la conversión de Ang I a Ang II. Una ventaja adicional es que la inhibición de la enzima promueve una acumulación de bradicinina cuyo efecto es vasodilatador a través de la liberación de óxido nítrico. En consecuencia, se reduce la resistencia vascular periférica no generalizada sino restringida a los territorios en donde la angiotensina es más activa, sin incrementar la tasa cardíaca, ni provocar natriuresis (Velasco y Hernández, 2001).

La hidralazina es un antihipertensivo que actúa a través de la vasodilatación directa de las arteriolas, con la consecuente reducción de la resistencia periférica. La vasodilatación producida por la hidralazina causa activación de los mecanismos compensatorios mediados por los barorreceptores a nivel cerebral. Se usa ampliamente para el tratamiento de la hipertensión asociada al embarazo (Velasco y Hernández, 2001).

IV. HIPÓTESIS.

A nivel renal, el captopril previene los cambios morfológicos y disminuye la respuesta presora a la angiotensina II en ratas con hipertensión subcrónica.

V. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto del tratamiento antihipertensivo sobre las respuestas vasculares renales a la angiotensina II y sobre las modificaciones histológicas en riñones de ratas con hipertensión subcrónica.

5.2 Objetivos particulares.

1. Analizar el efecto de los tratamientos antihipertensivos sobre la respuesta presora a la angiotensina II en riñón de ratas con hipertensión subcrónica.
2. Analizar histológicamente las estructurales renales de las ratas con hipertensión subcrónica con y sin tratamientos antihipertensivos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 CAPÍTULO 1. “Respuestas vasculares y cambios tisulares en riñón de ratas con hipertensión inducida con L-NAME: participación del sistema renina-angiotensina”.

Rev Mex Cienc Farm 44 (3) 2013

Revista de FARMACÉUTICAS
MÉDICA Y BIOLÓGICA
DE GUAYMAS Y PUEBLA

Trabajo científico

Respuestas vasculares y cambios tisulares en riñón de ratas con hipertensión inducida con L-NAME: participación del sistema renina angiotensina

Vascular responses and tissular changes in kidney from rats with L-NAME induced hypertension: the renin-angiotensin role

Areli Gutiérrez-Pérez,¹ José Rafael Rodríguez-Bonaparte,² Salvador Manzo-Avalos,¹ Daniel Godínez-Hernández,¹ Homero Reyes-De la Cruz¹

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

²Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Resumen

Existe controversia con respecto a si los tratamientos antihipertensivos que inciden sobre el sistema renina angiotensina (SRA) son capaces de prevenir el desarrollo de complicaciones durante la hipertensión que pueden desencadenar la insuficiencia renal. En el presente trabajo se analizó la respuesta a la angiotensina II y los cambios tisulares renales durante la hipertensión subcrónica inducida en ratas con L-NAME, con y sin tratamiento antihipertensivo. Se observó que el captopril logró mantener activo el SRA para responder a los cambios vasculares que requiere el riñón aún después de establecida la hipertensión. El tratamiento antihipertensivo con captopril, y no con la hidralazina, retardó la aparición de modificaciones histológicas renales que podrían desencadenar la insuficiencia renal y la falla orgánica como complicación de la hipertensión arterial.

Abstract

There is a controversy about whether treatments that target the renin angiotensin system (RAS) are able to prevent complication development during hypertension that could cause kidney failure. In the present work the kidney's physiological state and tissular changes were analyzed during L-NAME-induced subchronic hypertension in rats with or without antihypertensive treatment. It was observed that captopril preserves RAS activity to respond to vascular changes required by the renal function even after hypertension establishment. Antihypertensive treatment with captopril but not with hydralazine, delays the appearance of histological modifications that could cause kidney failure and organic failure as a complication of arterial hypertension.

Palabras clave: hipertensión, cambios tisulares, captopril.

Key words: hypertension, tissular changes, captopril.

Correspondencia:

Dr. Homero Reyes de la Cruz
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Edificio B3, Ciudad Universitaria, CP. 58030. Morelia,
Mich., México
Tel/Fax: +52 443 326 5788
e-mail: delacruz@umich.mx

Fecha de recepción: 26 de noviembre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones: 20 de mayo de 2013

Fecha de aceptación: 01 de julio de 2013

Introducción

La hipertensión arterial es una condición patológica caracterizada por un incremento de la presión arterial (presión arterial sistólica (PAS) >140 mm de Hg, y/o presión arterial diastólica (PAD) >90 mm de Hg),¹ como consecuencia de cambios hemodinámicos macro y microvasculares. Además, en esta patología existe un desequilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores del organismo. Estos cambios que anteceden en el tiempo a la elevación de la presión, producen lesiones orgánicas específicas. En este sentido, uno de los principales órganos blanco de la hipertensión es el riñón, desarrollando a largo plazo hipertrofia renal e insuficiencia renal crónica.¹

En México, el 30.8 % de la población de más de 20 años padece hipertensión, lo que representa a 17 millones de adultos. Más del 50 % de los hombres y más del 60 % de las mujeres de más de 60 años de edad padecen hipertensión. Estudios epidemiológicos han mostrado que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en casi todos los países del mundo incluido México.²

Actualmente se emplean distintos blancos terapéuticos en el tratamiento de la hipertensión, entre los que destacan: los canales de calcio de tipo L, los receptores adrenérgicos, el péptido angiotensina II (Ang II), el receptor AT1, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), entre otros.^{3,4} Muchos de los blancos descritos anteriormente están involucrados en la regulación del sistema renina-angiotensina (SRA), que a su vez se considera como uno de los más importantes en el desarrollo y establecimiento de la hipertensión.⁵ Se sabe que como efecto predominante, la Ang II produce vasoconstricción en las células de músculo liso vascular a través de su interacción con el receptor AT1 y como consecuencia de la activación de la vía de transducción de señales río abajo del receptor.⁶ También, se ha demostrado la influencia de la Ang II en los procesos de angiogénesis, como promotor de la hipertrofia cardíaca y como un factor determinante en el desarrollo de la disfunción endotelial, entre otros.⁷

Por otro lado, la mayoría de los modelos de hipertensión conocidos, incluida la hipertensión en el humano, reproducen características comunes, entre ellas una disminución en la respuesta vasodilatadora al óxido nítrico. En este sentido, existe un modelo de hipertensión crónica que se logra por la administración a largo plazo del inhibidor de las óxido nítrico sintasas, el NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).^{8,9} Los principales cambios celulares observados durante la hipertensión en este modelo, están relacionados con la disfunción endotelial y el aumento en la resistencia vascular,

además de provocar una intensa vasoconstricción renal, con marcada reducción del flujo sanguíneo renal y una ligera reducción en el índice de filtración glomerular.⁸ A nivel tisular, este modelo de hipertensión induce modificaciones histológicas tales como lesiones escleróticas en los vasos sanguíneos y en el glomérulo,¹⁰ provoca una reducción en el número de células endoteliales glomerulares y en los capilares peritubulares, glomeruloesclerosis,¹¹ daño tubular y fibrosis intersticial en la zona medular renal.¹²

Este modelo de hipertensión por deficiencia de óxido nítrico permite analizar claramente un fenómeno renal llamado "autorregulación", por el cual el riñón mantiene un estado de equilibrio entre la vasodilatación arterial causada por el óxido nítrico y la vasoconstricción promovida por la Ang II para que se lleven a cabo las funciones de filtración, excreción y reabsorción renal.¹³

La gran mayoría de los estudios sobre el efecto de la hipertensión en los diferentes órganos se han realizado en modelos de hipertensión crónica y existen escasos reportes de los efectos en etapas tempranas de esta patología. Además, los resultados obtenidos con modelos de hipertensión crónica son controversiales respecto a si los tratamientos que inciden sobre el SRA son capaces de prevenir el desarrollo de complicaciones durante la hipertensión tales como la insuficiencia renal.¹³⁻¹⁶ Por esta razón, en el presente trabajo se estudiaron las respuestas presoras a la Ang II como reflejo del estado fisiológico renal, utilizando el sistema de órgano aislado y perfundido tipo Langendorff¹⁷ y se analizó si existen modificaciones histológicas con y sin tratamientos con captopril (que incide directamente sobre el SRA inhibiendo a la ECA) y la hidralazina (un vasodilatador con blancos independientes del sistema), usando como modelo ratas con hipertensión subcrónica inducida por la administración de L-NAME por cuatro semanas previas al tratamiento antihipertensivo.

Material y método

Reactivos

El captopril, la hidralazina, el L-NAME y la angiotensina II se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (USA).

Manejo de animales

Los animales de laboratorio utilizados fueron sacrificados de acuerdo a los procedimientos establecidos en las regulaciones federales para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural en México; y con la aprobación del Comité de Investigación y Ética Institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Grupos experimentales

Se emplearon ratas Wistar macho de 4 semanas de edad, las cuales se dividieron en 6 grupos, que a continuación se detallan:

GRUPO CONTROL (CT): ratas exentas de tratamiento (control).

GRUPO CAPTOPRIL (CP): ratas control tratadas con captopril (30 mg/kg/día).

GRUPO HIDRALAZINA (HD): ratas control tratadas con hidralazina (50 mg/kg/día).

GRUPO L-NAME (LN): ratas tratadas con L-NAME (50 mg/kg/día).

GRUPO L-NAME + CAPTOPRIL (LC): ratas hipertensas inducidas con L-NAME y tratadas con captopril (30 mg/kg/día).

GRUPO L-NAME + HIDRALAZINA (LH): ratas hipertensas inducidas con L-NAME y tratadas con hidralazina (50 mg/kg/día).

La hipertensión se indujo por medio de la administración del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico: NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) hasta el término de los tratamientos y sacrificio de los animales. Los tratamientos se administraron por un total de ocho semanas. Para los grupos de ratas normotensas (CT, CP y HD), las primeras cuatro semanas se les dio agua sin ningún tratamiento adicional, y las siguientes cuatro semanas se les administró captopril para el grupo CP e hidralazina al grupo HD a las dosis antes mencionadas; el grupo CT continuó sólo con agua. En el caso de los grupos de ratas hipertensas (LN, LC y LH), las primeras cuatro semanas se les administró el inhibidor L-NAME y en las últimas cuatro se les dio captopril (grupo LC) e hidralazina (grupo LH) además del inhibidor; el grupo LN continuó con el tratamiento del inhibidor solamente. Debido a que la administración de los fármacos fue por vía oral, se midió el peso y el consumo de agua cada tercer día para ajustar las dosis. Después de dichos tratamientos se sacrificaron las ratas para realizar los ensayos propuestos.

Medición de los niveles de presión arterial

Se hizo una medición semanal de los niveles de presión arterial de los animales de todos los grupos experimentales, utilizando un método pletoisométrico no invasivo en la cola del animal. El sistema usado fue el LE 5007 (Letica, PanLab, Barcelona, España).

Los animales fueron adiestrados previamente para reducir el estrés que pudiera interferir en las mediciones de presión arterial. Las ratas conscientes se pusieron en un cuanto con temperatura controlada (30°C), fueron introducidas en cilindros plásticos para inmovilizarlas, dejando fuera de éstos la cola del animal. Posteriormente se les colocó un manguito en la cola y se procedió a realizar la lectura de la presión. Cada medición se realizó por triplicado.

Preparación de riñón aislado y perfundido. Sistema de órgano aislado tipo Langendorff

La preparación para órgano aislado se realizó de acuerdo al protocolo de Sosa y cols.¹⁷ Se hicieron curvas dosis-respuesta graduales a la Ang II, administrando dosis crecientes de Ang II con rangos de concentración de 1×10^{-9} M a 1×10^{-6} M, por inyección en bolo, a través de la cánula insertada en la arteria renal para obtener incrementos de la presión de perfusión renal, como a continuación se describe. La solución de Ang II se preparó en el momento de su utilización al 0.5% de Na_2CO_3 . Bajo anestesia profunda, se extrajo el riñón derecho y se canuló la arteria renal, para después montar el riñón en un sistema de órgano aislado tipo Langendorff. El riñón se perfundió con solución de Krebs-Henseleit, a pH 7.4, burbujeada con una mezcla de 95% de O_2 -5% de CO_2 y se mantuvo a 37 °C hasta la estabilización de la presión de perfusión. El flujo se ajustó a 10 ml/min para obtener una presión basal de perfusión. El incremento en la presión de perfusión se midió utilizando un transductor de presión (Grass, FT03) acoplado a un sistema de adquisición de datos (Biopac, MP100). Los cambios en la presión de perfusión se interpretaron como un índice de aumento en la resistencia arterial renal y, por lo tanto, como un efecto vasoconstrictor.

Medición del índice de hipertrofia renal

Para evaluar de manera indirecta la hipertrofia renal, se calculó el índice de hipertrofia para el cual, se obtiene el peso húmedo del órgano y se divide por el peso del animal completo.

Preparaciones histológicas del riñón

El riñón completo se perfundió con paraformaldehído al 4% hasta la eliminación total de la sangre. A continuación se llevó a cabo el fijado del tejido dejando el órgano 24-48 hr en paraformaldehído al 4%, seguido de tres pasos de deshidratación en soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30%, respectivamente. Posteriormente el riñón completo se incluyó en una matriz crioprotectora de OCT y se almacenó a -20° C. Después, se procedió a hacer los cortes histológicos de 10 µm de espesor en un criostato (Hyrax C25, Zeiss), para enseguida teñirlos empleando la técnica de hematoxilina-eosina (H-E). Finalmente, se analizaron las laminillas en un microscopio óptico en campo claro (Leica DM3000) y se capturaron las imágenes para evaluar cualquier modificación en las estructuras renales.

Resultados y discusión**Inducción de la hipertensión con L-NAME en ratas**

Con la finalidad de validar el modelo de hipertensión inducida con la administración de L-NAME, se llevó a cabo la medición de los niveles de presión arterial de las ratas antes y durante los tratamientos (Figura 1). Dichos niveles se mantuvieron en

valores normales en el grupo control durante las 8 semanas de medición. En los grupos L-NAME o ratas hipertensas (LN), se observó un incremento gradual de la presión arterial, alcanzando niveles de hipertensión por arriba de 140 mmHg en la semana 2 de tratamiento. Al inicio de los tratamientos antihipertensivos, esto es, a partir de la cuarta semana, observamos que en los grupos con tratamiento captopril (CP) e hidralazina (HD) en ratas normotensas, no hubo cambios significativos en los valores respecto del grupo control manteniendo niveles normales de presión arterial. En los grupos de ratas hipertensas tratadas con captopril (LC) e hidralazina (LH) a partir de la cuarta semana se observó una disminución paulatina de los niveles de presión arterial sistólica hasta llegar a niveles normales en la última semana del tratamiento.

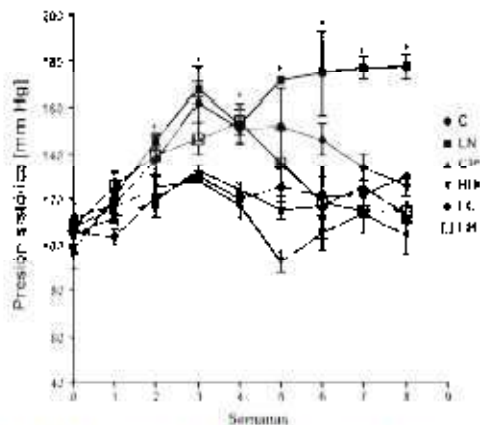


Figura 1. Efecto del Captopril y la Hidralazina sobre la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas. La gráfica muestra las medidas semanales de la presión arterial sistólica de 6 grupos de ratas Wistar macho. Las ratas de 4 semanas de edad fueron tratadas con vehículo (normotensas) o con L-NAME (hipertensas) durante las primeras 4 semanas. A partir de la semana 4, se iniciaron los tratamientos antihipertensivos con captopril (30 mg/kg/día) e hidralazina (50 mg/kg/día). Normotensas: CT, control; CP, captopril; HD, hidralazina. Hipertensas: LN, L-NAME; LC, L-NAME/captopril; LH, L-NAME/hidralazina. Prelim, corresponde a la medición de la presión una semana antes del inicio de los tratamientos. $n = 3$. * $p < 0.05$ vs. CT, prueba de Tukey.

Estos datos demuestran que la administración de L-NAME, un inhibidor de las óxido nítrico sintasas, nos permite obtener un modelo adecuado de hipertensión subcrónica inducida por deficiencia del óxido nítrico en las ratas. Nuestros datos concuerdan con los hallazgos de Baylis y cols¹⁸ y Ribeiro y cols.¹⁹ donde establecen que la administración de L-NAME eleva los niveles de presión sistémica por arriba de los 140 mmHg, cifra límite para el diagnóstico de hipertensión arterial. Además, las dosis de los tratamientos antihipertensivos administradas a los animales, son efectivas en la disminución de arterial. Además, las dosis de los tratamientos antihipertensivos

administradas a los animales, son efectivas en la disminución de los niveles de presión en las ratas hipertensas y no causan modificación en la presión arterial sistémica de las ratas normotensas.

Evaluación de las respuestas vasculares renales promovidas por la administración de dosis crecientes de Angiotensina II
Para evaluar la respuesta renal a la Ang II, se midieron los cambios en la presión de perfusión en respuesta a dosis crecientes de Ang II en los riñones extraídos de los animales de todos los grupos experimentales mencionados anteriormente, utilizando el modelo de órgano aislado y perfundido tipo Langendorff. Este modelo nos permite evaluar respuestas vasculares manteniendo el órgano aislado, en las condiciones más cercanas al estado fisiológico.¹⁷ Fue de nuestro interés analizar el estado del sistema renina-angiotensina por su relevancia en el origen y establecimiento de la hipertensión y como uno de los principales mecanismos de regulación renal sobre la presión arterial sistémica.⁵

Después de montar los riñones, se dejó un periodo de estabilización de 15 minutos, posteriormente con el fin de analizar el estado fisiológico inicial de cada riñón montado, se midió la presión de perfusión basal (Figura 2), donde se observó una disminución significativa en los niveles de la presión de perfusión basal sólo en los riñones de ratas normotensas tratadas con el captopril (CP) en comparación con el grupo control (CT), sugiriendo una predominancia de los factores vasodilatadores en el órgano, causada por el tratamiento antihipertensivo que a nivel local actúa como un hipotensor. Ninguno de los otros tratamientos modificó los niveles de perfusión basal.

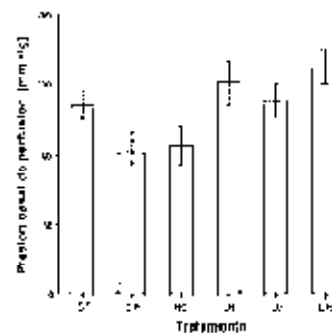


Figura 2. Efecto del captopril y la hidralazina sobre la presión basal de perfusión en los riñones de ratas normotensas e hipertensas. A los 6 grupos de ratas se les extrajo el riñón derecho y se montó en un equipo de órgano aislado y perfundido tipo Langendorff. La gráfica muestra la presión de perfusión de los riñones después de un periodo de estabilización de 15 minutos posterior al montaje. Normotensas: CT, control; CP, captopril; HD, hidralazina. Hipertensas: LN, L-NAME; LC, L-NAME/captopril; LH, L-NAME/hidralazina. $n = 9$. * $p < 0.05$ vs. CT (t student).

Posteriormente, se realizaron curvas dosis-respuesta a la Ang II utilizando un rango de concentraciones entre 1×10^{-9} M y 1×10^{-5} M en los riñones obtenidos de los animales de todos los tratamientos. Primero se compararon los efectos de las diferentes concentraciones de Ang II en los riñones del grupo control (CT) contra el grupo hipertenso (LN), en este análisis no se observaron diferencias significativas en el incremento de la presión de perfusión en ambos grupos (Figura 3). Se esperaba que en el grupo de las ratas hipertensas, existiera un estado de hiperreactividad a la Ang II, sin embargo, no ocurrió así, lo cual indica que en nuestro modelo de hipertensión subcrónica, aún no se perciben cambios en la respuesta renal a la Ang II, además de que es posible que exista una activación de la producción de sustancias vasodilatadoras como las prostaglandinas,²⁰ como un efecto compensatorio por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico a nivel renal.

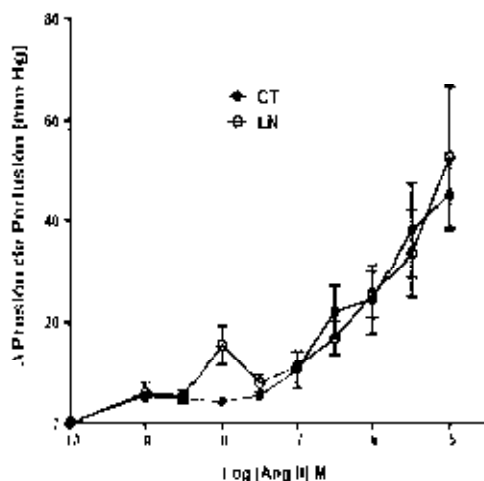


Figura 3. Efecto de la Ang. II sobre el delta de la presión de perfusión en los riñones de ratas control e hipertensas. Una vez montados y estabilizados los riñones se procedió a medir los cambios en la presión de perfusión renal en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de Ang II a los grupos de ratas normotensas control (CT) e hipertensas (LN). Entre cada dosis se esperó hasta obtener el efecto máximo y la completa recuperación de la presión de perfusión basal para adicionar las dosis subsiguientes. $n = 5$.

Para evaluar las respuestas vasculares en respuesta a la Ang II promovidas por los tratamientos con captopril o hidralazina en ratas normotensas, se compararon las curvas obtenidas de estos grupos (Figura 4). En los grupos de ratas normotensas (CT) y con tratamientos con captopril o hidralazina (CP y HD, respectivamente), tampoco se observaron diferencias significativas en la respuesta a la Ang II. Sin embargo, la Figura 4 reveló que las curvas de los riñones provenientes de los

grupos con tratamientos antihipertensivos, tienen un ligero desplazamiento hacia la izquierda, es decir, un ligero aumento en la sensibilidad de la respuesta presora a la Ang II, indicando que aunque las dosis de antihipertensivos utilizadas no provocaron cambios de presión arterial a nivel sistémico (Figura 1), sí se observaron ligeras modificaciones a nivel renal. Al emplear el tratamiento con captopril, se observó la inhibición del sistema renina-angiotensina, que en condiciones normales se compensa, ya sea por elevar el número de receptores AT1 o bien, por un mejor acoplamiento de la cascada de señalización intracelular como lo mencionan Zicha y Kimes⁴ y Navar y cols.²¹ En el grupo donde se administró el tratamiento con hidralazina, este cambio de sensibilidad a la Ang II, puede explicarse a través de una regulación a la alta^{5,21} del sistema renina-angiotensina, en respuesta a la disminución en el tono vascular renal provocado por el efecto vasodilatador de la hidralazina, para mantener las condiciones de presión del órgano.

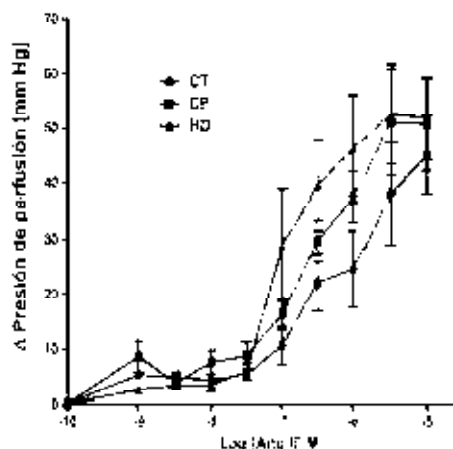


Figura 4. Efecto de la Ang. II sobre el delta de la presión de perfusión en los riñones de ratas normotensas con tratamientos antihipertensivos. Una vez montados y estabilizados los riñones se procedió a medir los cambios en la presión de perfusión renal en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de Ang II, a los grupos de ratas normotensas tratados por cuatro semanas en total, con los fármacos antihipertensivos captopril (CP) e hidralazina (HD). $n = 5$.

Al comparar la respuesta presora a la Ang II en riñones de ratas hipertensas (LN) contra los de las ratas hipertensas con tratamiento con captopril (LC) o hidralazina (LH) (Figura 5), se encontró un aumento en la respuesta a la Ang II, únicamente en los riñones obtenidos de las ratas hipertensas tratadas con captopril (LC), desde la concentración $1 \times 10^{-7.5}$ M y hasta la concentración 1×10^{-6} . Estos datos nos indican un aumento en la reactividad a la Ang II debido al tratamiento con captopril

durante la hipertensión, puesto que por separado, ni el L-NAME (Figura 3) ni el captopril (Figura 4), inducen cambios en la respuesta renal a la Ang II, a pesar de que el L-NAME induce la hipertensión sistémica (Figura 1). El tratamiento con hidralazina promueve también un aumento en la respuesta presora a la Ang II, sin embargo, esta es de menor magnitud y no es estadísticamente significativo, lo que nos indica que no existe alguna interacción entre el mecanismo de acción de la hidralazina con el sistema renina-angiotensina, ya que su mecanismo farmacológico promueve una predominancia del estado vasodilatador a través de la inhibición de la translocación de calcio del retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma, bloqueando así la vía clásica de contracción celular²² y probablemente afecta la función renal, debido a que no podría responder tan rápidamente a los cambios de presión requeridos para su función. Además, el detectar un aumento en la presión de perfusión con el tratamiento con captopril, puede interpretarse como la forma que tiene el riñón de responder a cambios en la presión arterial sistémica y a las demandas de su propia función. Sin embargo, la magnitud de la respuesta parece independiente del componente hemodinámico, es decir, de la sola disminución de los niveles de presión arterial sistémica y parece más relacionada con el mecanismo farmacológico de cada uno de los tratamientos. En el caso del tratamiento con captopril, cuyo mecanismo de acción incide directamente sobre el SRA, se observó una mayor reactividad a la Ang II respecto al tratamiento con hidralazina, sugiriendo que al actuar inhibiendo el SRA, probablemente se activan mecanismos para llevar a cabo una regulación a la alta del mismo, tales como un aumento en el número de receptores o un mejor acoplamiento de la vía transduccional,⁵ además de que el riñón cuenta con una fina regulación en cuanto a la localización, almacenamiento y diferencia de efectos del sistema renina-angiotensina local²¹ para llevar a cabo sus funciones de filtración, reabsorción y eliminación.

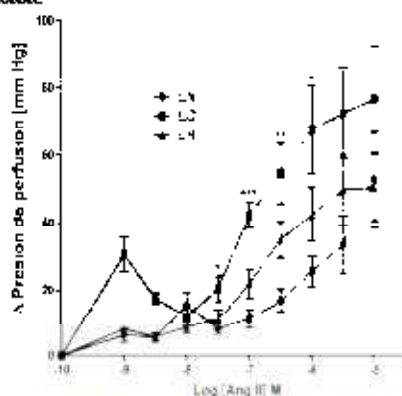


Figura 5. Efecto de la Ang II sobre el delta de la presión de perfusión de los riñones de ratas hipertensas e hipertensas con

tratamientos antihipertensivos. Una vez montados y estabilizados los riñones se procedió a medir los cambios en la presión de perfusión renal en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de Ang II, a los grupos de ratas hipertensas (LN), hipertensas tratadas con captopril (LC) o hidralazina (LH). $n = 5$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. LN. Prueba de Tukey.

Todos los datos anteriores validan el modelo de hipertensión subcrónica utilizado, donde se tienen animales con la presión arterial sistólica por arriba de los 140 mmHg, indicativos de la hipertensión y con cambios ligeros en las respuestas vasculares expresadas en función de la presión de perfusión renal, obtenidas en nuestro modelo de órgano aislado y perfundido, de los grupos de ratas hipertensas tratadas con captopril. Sin embargo, no se pueden descartar hasta ahora, alteraciones a nivel celular en el tejido renal.

Medición del índice de hipertrofia en el riñón

Se ha descrito bastante acerca del desarrollo de hipertrofia como una consecuencia de la hipertensión arterial crónica en el corazón. Se sabe que el mantenimiento de niveles de presión arterial sistémica por arriba de los 140/90 mmHg provoca la hipertrofia del ventrículo izquierdo cardíaco con complicaciones fatales a largo plazo,²³ sin embargo, en el caso del riñón, es complejo establecer la hipertrofia debido a que su aparición es multifactorial.

Fine en 1986²⁴ describió la dependencia de la edad, el estímulo, el factor hormonal, la disponibilidad de nutrientes, el tiempo de la patología, entre otros factores que van a definir si se activará la vía para producir hipertrofia; también mencionó que existen otras modificaciones estructurales en el riñón, que aunque previas al desarrollo de hipertrofia, son indicativos de daño renal.²⁴ Para evaluar de manera indirecta la aparición de modificaciones en el riñón y en especial la presencia de hipertrofia en el órgano, se calculó el índice de hipertrofia que se obtiene del cociente del peso húmedo del órgano y el peso del animal completo (Figura 6).

En nuestras condiciones no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En los grupos de ratas hipertensas inducidas con L-NAME, a pesar de observar un incremento sostenido en la presión arterial sistémica, no se detectó de manera macroscópica, la hipertrofia en el riñón. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el hecho de no encontrar cambios en el índice de hipertrofia renal, valida nuevamente nuestro modelo y tampoco descarta la aparición de cambios morfológicos adicionales en el riñón a nivel tisular, que se vean reflejados en una futura disminución de la función renal.

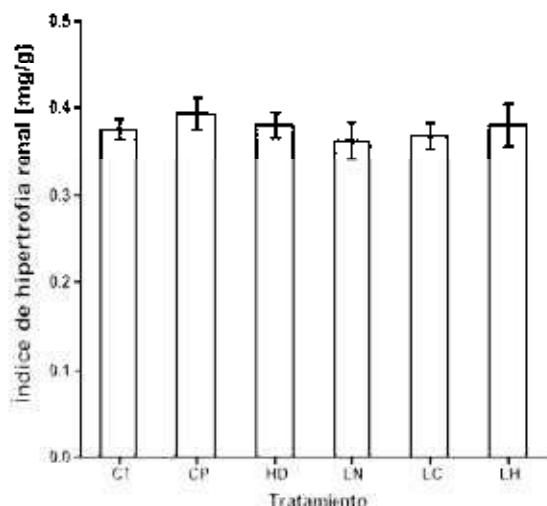


Figura 6. Índice de hipertrofia renal de ratas normotensas e hipertensas, con y sin tratamiento antihipertensivo. Normotensas: CT, control; CP, captopril; HD, hidralazina; Hipertensas: LN, L-NAME; LC, L-NAME/captopril; LH, L-NAME/hidralazina; PR, peso húmedo del riñón; PT, peso total de la rata. Una vez desmontado el riñón del equipo de órgano aislado y perfundido, se quitó el exceso superficial de líquido del riñón y posteriormente se eliminó cualquier resto de la arteria renal y tejido conjuntivo y graso para proceder a pesar el órgano. $n = 9$.

Evaluación de las modificaciones histológicas en el riñón
Para determinar la existencia de cambios tisulares en el riñón de las ratas hipertensas y el efecto de los tratamientos antihipertensivos en dicho órgano, se realizaron cortes transversales del riñón completo de cada uno de los grupos tratados, donde se analizó la morfología de las diferentes estructuras renales. Posteriormente, los cortes se tiñeron empleando la técnica de hematoxilina-eosina, que tiñe de color azul los núcleos celulares y de rojo el citoplasma y los componentes de naturaleza proteica.²⁵ El análisis se realizó en las dos divisiones histológicas que componen al riñón, la corteza y la médula. En la primera se evaluó el tamaño y la celularidad de los glomérulos, y la relación ovoido glomerular-cápsula de Bowman. Los aspectos tubulares evaluados fueron el diámetro, grosor de la pared y la presencia de material eosinófilo y hialino. En el espacio intersticial y la región medular, se analizó la composición del tejido conectivo, el número de vasos sanguíneos por campo y la cantidad de volumen sanguíneo contenido, además de la búsqueda de datos compatibles con edema.

En los cortes histológicos de riñones de ratas normotensas (grupo CT) (Figura 7 A-C), se observan glomérulos de tamaño

normal, así como el número de las células mesangiales, la relación entre el ovoido glomerular y el espacio de Bowman está conservada. En la Figura 7B se aprecian túbulos sin alteraciones en el tamaño ni en la luz, espacio intersticial de contenido homogéneo, sin dato de fibrosis o infiltrado celular inflamatorio. Respecto a los vasos sanguíneos, no hay datos de vasocongestión o disminución del volumen sanguíneo que indiquen compromiso de la perfusión renal (Figura 7C).

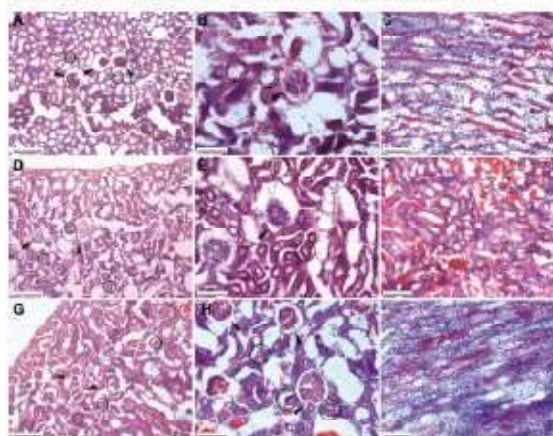


Figura 7. Efecto del captopril y la hidralazina sobre las estructuras renales en ratas normotensas. Una vez desmontado el riñón del equipo de órgano aislado y perfundido, el tejido se fijó usando paraformaldehído, enseguida se deshidrató y fue embebido en el polímero OCT para su posterior corte en microtomo y teñido con la técnica hematoxilina-eosina. A-C, grupo control (CT); D-F, grupo captopril (CP); G-I, grupo hidralazina (HD). A, D, G, Estructura cortical general 20X (barras de escala 200 μ m). B, E, H, Glomérulo renal y estructuras circundantes 40X (barras de escala 100 μ m). C, F, I, Zona medular renal 40X (barras de escala 100 μ m). Cabezas de flecha, glomérulos; Círculos, túbulos. Corte representativo de una $n = 5$.

En los cortes histológicos de riñones de ratas normotensas tratadas con captopril (CP) (Figura 7 D-F), se aprecian glomérulos de tamaño normal. En la Figura 7E se observa un glomérulo con un ligero aumento en la celularidad en el mesangio y el espacio de Bowman. La zona intersticial no presenta alteraciones, se detecta una leve disminución de la luz tubular a expensas de células y vasos sanguíneos en contrasentido por el corte, pero sin alteraciones.

Al corte histológico de riñones de ratas normotensas tratadas con hidralazina (HD) (Figura 7 G-I), se observa una ligera pérdida de la relación entre capilares glomerulares y espacio de Bowman. Se aprecia una mayor cantidad de material eosinófilo en comparación de un glomérulo normal, sugiriendo la presencia de un depósito de proteína en la matriz mesangial, también se observa un aumento en el número de células en el

espacio intersticial (Figura 7 G-H). En la Figura 7I se observa que los capilares medulares contienen una menor cantidad de sangre al interior de su luz, debido a la redistribución sanguínea provocada por la vasodilatación producida por el fármaco.

En los cortes histológicos de ratas hipertensas (LN) (Figura 8 A-C), en la zona cortical (Figura 8A) se observa una marcada disminución en el número de glomérulos, este dato sugiere una permanencia de un estímulo lesivo que sobrepasó los límites adaptativos, teniéndose como consecuencia una lesión irreversible en el tejido renal, que se traduce en la pérdida de los glomérulos durante la hipertensión.²⁶

Los glomérulos observados (Figura 8B), presentan hiperplasia de los capilares glomerulares y en consecuencia la pérdida total de la relación ovillo glomerular-espacio de Bowman, siendo el espacio urinario el que ocupa la mayor parte del glomérulo. Este fenómeno obedece a la hiperplasia e hipertrofia compensadora que aumenta la capacidad funcional de un tejido cuando se ve sometido al aumento de la presión intraglomerular por un estado de sobrecarga hemodinámica continua, como es la hipertensión arterial.²⁶

Se aprecia también una disminución de los componentes en el espacio intersticial que se explica por los cambios isquémicos producidos por las modificaciones en el tono vascular de las arteriolas aferente y eferente. En este punto, la Ang II provee un soporte adicional para mantener la filtración glomerular, a pesar de que la presión de perfusión disminuya.²⁷ Se observa un aumento de la celularidad en el glomérulo y una marcada eosinofilia en la matriz mesangial, evidenciada por un aumento en su grosor.

Las células del mesangio son capaces de secretar factores que promueven el depósito de colágeno y posterior desarrollo de glomerulosclerosis en la lesión crónica que repercute directamente en el aspecto hemodinámico.²⁶ Se encontró un aumento en el grosor de la pared de las arteriolas a expensas de mayor celularidad y tejido fibroso, este fenómeno se conoce como fibrosis arteriolar y habla de proliferación del músculo liso y sustitución del tejido por fibrosis.²⁸

En la Figura 8C se observa que los capilares de la región medular presentan una marcada vasocongestión como resultado de un proceso de remodelación vascular que se manifiesta como una alteración en el diámetro de la luz con marcada reducción del flujo sanguíneo e incremento en la resistencia vascular.²⁶ Todos los cambios morfológicos descritos anteriormente son consistentes con arteriosclerosis y modificaciones tubulointersticiales que hablan de una función renal disminuida.

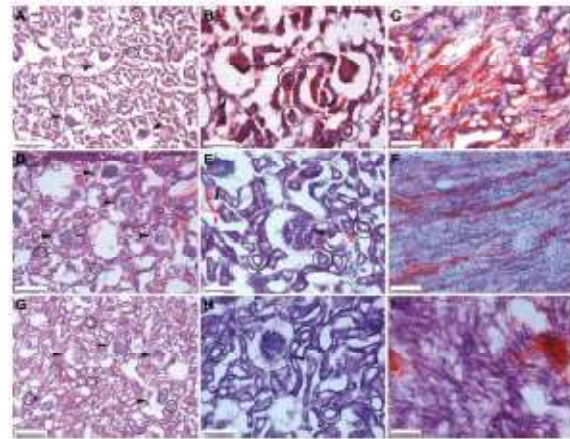


Figura 8. Efecto del captopril y la hidralazina sobre las estructuras renales en ratas hipertensas. Una vez desmontado el riñón del equipo de órgano aislado y perfundido, el tejido se fijó usando paraformaldehído, enseguida se deshidrató y fue embebido en el polímero OCT para su posterior corte en microtomo y teñido con la técnica hematoxilina-eosina. A-C, grupo hipertensas (LN); D-F, grupo hipertensas con captopril (LC); G-I, grupo hipertensas con hidralazina (LH). A, D, G, Estructura cortical general 20X (barra de escala 200 μ m). B, E, H, Glomérulo renal y estructuras circundantes 40X (barra de escala 100 μ m). C, F, I, Zona medular renal 40X (barra de escala 100 μ m). Cabezas de flecha, glomérulos; Círculos, túbulos. Corte representativo de una $n = 5$.

En los cortes de ratas hipertensas con tratamiento captopril (LC) (Figura 8 D-F), se observa el número de glomérulos por campo dentro de los límites normales, sin alteración de la celularidad glomerular, una relación ovillo glomerular-espacio de Bowman conservada, y túbulos y vasos sanguíneos de calibre normal. Por lo tanto, existe una marcada reversión de los cambios estructurales adaptativos del riñón como resultado del tratamiento antihipertensivo administrado en etapas tempranas del establecimiento de la hipertensión subcrónica inducida con L-NAME. Se observa el fenómeno de angiosclerosis presente en los cortes de riñón de ratas hipertensas (LN) (Figura 8C), sin embargo con un grado mucho menor. En la Figura 8F se aprecian los capilares medulares sin alteraciones.

En los cortes de ratas hipertensas con tratamiento antihipertensivo hidralazina (LH) (Figura 8 G-I), se observa un número normal de glomérulos en la región cortical, aumento importante del espacio luminal de túbulos y vasos sanguíneos en comparación con la rata hipertensa sin tratamiento (LN) y la tratada con captopril (LC). En la Figura 8H no se aprecia

disminución de la luz tubular por aumento en la celularidad; sin embargo, existe una gran cantidad de material hialino y eosinófilo homogéneo, depositado en la luz tubular. La Figura 8I muestra una disminución en la presencia de sangre intravascular por un fenómeno de redistribución sanguínea hacia los glomérulos para conservar la función renal.

Estos hallazgos sugieren que la hipertensión subcrónica causa modificaciones tisulares en el riñón que desencadenan a largo plazo un daño renal y por lo tanto la complicación de la patología. Nuestros datos concuerdan con los cambios histológicos reportados por Zaiz y Baylis⁸, Boffa y cols¹⁰, y Bouriquet y cols²⁹, en el modelo de hipertensión inducida con L-NAME.

Para los cortes de riñón de ratas hipertensas con tratamiento antihipertensivo con captopril observamos una restitución casi completa de la arquitectura renal normal, tanto en la zona cortical como en la medular (Figura 8 D-F).

En los cortes de riñón de ratas hipertensas con tratamiento antihipertensivo con hidralazina (LH) (Figura 8 G-I), encontramos cambios adaptativos primarios que en la hipertensión crónica se pueden convertir en una lesión irreversible del tejido renal con la consiguiente disminución de la función.

Conclusiones

El riñón desempeña una función muy importante en la regulación de los niveles de presión arterial sistémica; sin embargo, el mismo cuenta con mecanismos complejos en el manejo de las resistencias vasculares a su interior para llevar a cabo sus múltiples funciones de filtración, excreción y reabsorción. El equilibrio entre el sistema renina angiotensina local renal y la síntesis de óxido nítrico permiten la existencia de gradientes de presión arterial en el interior del órgano, compartimentalizados de acuerdo a la función que se realiza en cada zona renal. Durante la hipertensión arterial se presenta la disfunción endotelial, donde se provoca un desajuste entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores, lo que dificulta un correcto control de las resistencias vasculares renales y por lo tanto existen cambios que intentan suplir las funciones perdidas y que desencadenan invariablemente en insuficiencia renal. Nosotros encontramos que el tratamiento antihipertensivo con captopril logra mantener activo el SRA para responder a los cambios vasculares que requiere la función renal aún después de establecida la hipertensión.

El tratamiento antihipertensivo con captopril, y no con hidralazina, retarda la aparición de modificaciones histológicas renales que desencadenan la insuficiencia renal y la falla

orgánica como complicación de la hipertensión arterial.

Por lo tanto, el bloqueo del SRA ayuda a prevenir el daño renal y mejora las respuestas vasculares renales aún después de establecida la hipertensión.

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló con el apoyo de los proyectos CONACYT No. 25540 y CIC-UMSNH No. 2.27 y 2.36 2010 y 2011. AGP es becaria de CONACYT con número 21552. Agradecemos a las Dr. en C Alma Lilia Fuentes-Farías y Esperanza Meléndez-Herrera del Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales de la UMSNH por el apoyo técnico en la parte histológica.

Referencias

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*. 2003; 42(6):1206-52.
2. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. 2007. <http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>. Acceso 26 Nov 2012.
3. Swift PA, MacGregor GA. The frequent need for three or more drugs to treat essential hypertension. What evidence for optimal combinations? *J Renin-Angio-Aldo S*. 2002; 3(2):103-108.
4. Kalra S, Kalra B, Agrawal N. Combination therapy in hypertension: An update. *Diabetol Metab Syndr*. 2010; 2(1):44.
5. Zicha J, Kimes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat. *Physiol Rev*. 1999; 79(4):1227-82.
6. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol-Cell Ph*. 2007; 292(1):C82-C97.
7. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(1):11-34.
8. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*. 1998; 32(6):958-964.
9. Zhao Q, Egashira K, Inoue S, Usui M, Kitamoto S, Ni W, Ishibashi M, Hiasa K, Ichiki T, Shibuya M, Takeshita A. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation*. 2002; 105(9):1110-15.

10. Boffa J-J, Ying L, Dussault J-C, Chatziantoniou C. Improvements of renal lesions and function by angiotensin and endothelin receptor antagonism in nitric oxide-deficient rats. *J Renin-Angio-Aldo S.* 2001; 2(1 suppl):S211-S216.
11. Kang D H, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol.* 2002; 161(1):239-248.
12. Potichnowski AJ, Lu L, Cowley AW. Renal injury in angiotensin II-L-NAME-induced hypertensive rats is independent of elevated blood pressure. *Am J Physiol-Renal Physiol.* 2011; 300(4):F1008-F1016.
13. Staessen JA, Richart T, Wang Z, Thijs L. Implications of recently published trials of blood pressure-lowering drugs in hypertensive or high-risk patients. *Hypertension.* 2010; 55(4):819-831.
14. Matsumoto K, Morishita R, Moriuchi A, Tomita N, Yo Y, Nishii T, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Prevention of renal damage by Angiotensin II blockade, accompanied by increased renal hepatocyte growth factor in experimental hypertensive rats. *Hypertension.* 1999; 34(2):279-284.
15. Kett MM, Alcorn D, Bertam JF, Anderson WP. Enalapril does not prevent renal arterial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 25(3):335-342.
16. Kurtz TW, Pravenec M. Molecule-specific effects of Angiotensin II-receptor blockers independent of the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens.* 2008; 21(8):852-859.
17. Sosa-Luna CA, Astudillo de la Vega H, Sánchez-González DJ, Martínez-Salas SG, Vahdez-Espinosa R, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M. 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):32-50.
18. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 1992; 90(1):278-281.
19. Ribeiro MO, Adures E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992; 20(3):298-303.
20. Perinotto P, Bazzi A, Carra N, Orsico A, Valmadre G, Dall'aglio P, Nevazini A, Montanari A. Angiotensin II and prostaglandin interactions on systemic and renal effects of L-NAME in humans. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(8):1706-12.
21. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal Angiotensin II in hypertension. *Hypertension.* 2002; 39(2):316-322.
22. Ellershaw DC, Gurney AM. Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(3):621-631.
23. Richey PA, DiSessa TG, Somes GW, Alpert BS, Jones DP. Left ventricular geometry in children and adolescents with primary hypertension. *Am J Hypertens.* 2009; 23(1):24-29.
24. Fine L. The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1986; 29(3):619-634.
25. Genesser F. *Histología.* 3a ed. Editorial Médica Panamericana; 2000. p.39-40, 555-575.
26. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins y Cotran *Patología estructural y funcional.* 8ª Ed. Barcelona; 2005.
27. Palmer BF. Renal dysfunction complicating the treatment of hypertension. *N Engl J Med.* 2002; 347(16):1256-61.
28. Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GE, Rodríguez-Iturbe B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med.* 2002; 346(12):913-923.
29. Bonrquet N, Casellas D. Chronic L-NAME hypertension in rats and autoregulation of juxtaglomerular preglomerular vessels. *Am J Physiol-Renal Physiol.* 1995; 269(2):F190-F197.

VII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.

- Best y Taylor. 2003. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13a. ed. en español. Ed. Médica Panamericana. 1132 pp.
- Baylis C., Mitruka B., y Deng A.. 1992. Chronic Blockade of Nitric Oxide Synthesis in the Rat Produces Systemic Hypertension and Glomerular Damage. J. Clin. Invest. 90:278-281.
- Coffman M.T. y D. Crowley.. 2008. Kidney in hypertension: Guyton Redux. Hypertension 51;811-816.
- Chobanian A.V., Bakris G.L., Materson B.J., Oparil S., Wright J.T., Roccella E.J. 2004. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure.The JNC 7 Report. ; 42(6):1206-1252.
- De Gasparo, M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W. y Unger T.. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev 52(3): 415-72.
- GeneserFinn. 2000. Histología. 3a. ed. Editorial Panamericana. 743 pp.
- Goodman y Gilman. 2006. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 11a. ed. Ed. Mc. Graw Hill. 2018 pp.
- Guyton A.C. y J.E. Hall. 2006. Textbook of Medical Physiology. 11a. ed. Elsevier Saunders. 1116 pp.
- Kim, S. Y H. Iwao. 2000. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. Pharmacol Rev 52(1): 11-34.
- Liu V.W y P.L. Huang. 2008. Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. Cardiovascular Research 77, 19–29.
- Olaiz-Fernández G., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Rojas R., Villalpando-Hernández S., Hernández-Avila M., Sepúlveda-Amor J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

- Palmer RM, Ashton D.S., Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664 - 666.
- Pascuzzo C. 2008. *Farmacología Básica*. Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado". Venezuela. 927 pp.
- Ribeiro M.O., Antunes E., deNucci G., Lovisolo S.M. Y Zatz R.. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* sept.20(3):298-303.
- Robbins. 2006. *Patología Estructural y funcional*. 8a. ed. Ed. Elsevier. España. 1464 pp.
- Stuehr D.J., Santolini J., Wang Z.Q., Wei C.C., Adak S. 2004. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279: 36167–36170.
- Török J. 2008. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol. Res.* 57: 813-825.
- Velasco M. y R. Hernández. 2001. *Manual de Hipertensión Arterial*. Ed. Mc. Graw Hill Interamericana de Venezuela. 406 pp.
- Zatz R. y C. Baylis. 1998. Chronic Nitric Oxide Inhibition Model Six Years On. *Hypertension*;32:958-964.
- Zhang Y., Janssens S.P., Wingler K., Schmidt H.H., Moens A.L. 2011. Modulating endothelial nitric oxide synthase: a new cardiovascular therapeutic strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H634–H646.
- Zicha, J. y J. Kunes. 1999. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol. Rev.* 79(4): 1227-82.

VIII. ANEXO 1.

TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

1. Preparación de laminillas para cortes histológicos.

Para facilitar la adherencia de los cortes renales a los portaobjetos, se realiza el siguiente protocolo:

1. Preparar una solución para inmersión de las laminillas pesando 5g de grenetina para 1L de agua destilada.
2. Disolver en caliente (50-60°C), con agitación ligera.
3. A continuación, agregar 0.5g de dicromato de potasio. Mezclar con suavidad. (Esta solución debe conservarse en refrigeración, protegida de la luz hasta su uso).
4. Sumergir las laminillas 5 veces en la solución anterior, escurriendo el exceso.
5. Dejar en estufa a 70°C/24hrs para obtener el total secado y fijado de la solución.
6. Mantener las laminillas en refrigeración protegidas del polvo hasta su uso.

2. Protocolo extendido para conservación de tejidos para cortes histológicos.

1. Perfundir el órgano con una solución de paraformaldehído (PAF) al 4% hasta la completa eliminación de la sangre.
2. Dejar el órgano inmerso en la solución de PAF 4% por 24 hrs/8°C.
3. Hacer 3 lavados con buffer de fosfatos (PBS) estándar.
4. Dejar el órgano inmerso en una solución de sacarosa al 10% por 24hrs/8°C.
5. Hacer 3 lavados con buffer de fosfatos.
6. Dejar el órgano inmerso en una solución de sacarosa al 20% por 24hrs/8°C.

7. Hacer 3 lavados con buffer de fosfatos.
8. Dejar el órgano inmerso en una solución de sacarosa al 30% por 24hrs/8°C.
9. Hacer 3 lavados con buffer de fosfatos.
10. Incluir el órgano en resina OCT asegurándose que lo cubra en su totalidad.
11. Conservar a -20°C hasta hacer los cortes empleando micrótopo.