

**UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**INTERACCIÓN CARDIOVASCULAR
ANGIOTENSINA II-PÉPTIDO NATRIURÉTICO
EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EXPERIMENTAL**

**TESIS DOCTORAL
ANTONIO JOSÉ ORTIZ RUIZ**

Junio 1998

Tomás Quesada Pérez, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Murcia y Joaquín García-Estañ López, Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Murcia

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "**INTERACCIÓN CARDIOVASCULAR ANGIOTENSINA II-PÉPTIDO NATRIURÉTICO EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EXPERIMENTAL**", ha sido realizada por Antonio José Ortiz Ruiz bajo nuestra dirección. Una vez revisada y conforme, autorizamos su presentación para la obtención del título de Doctor en Medicina y Cirugía por considerar que posee el nivel suficiente y constituye un aportación original sobre el tema.

En Murcia, a 24 de Junio de 1998

Joaquín García-Estañ López

Tomás Quesada Pérez

A Carmen, María y Antonio
A mis padres, Antonio y Ovidia

Agradecimientos

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. Mecanismos de regulación de la presión arterial	1
II. Regulación nerviosa	2
III. Regulación humoral	3
III.1. Agentes vasoconstrictores	3
III.2. Agentes vasodilatadores	7
IV. Regulación renal	8
V. Hipertensión: modelos básicos.....	9
V.I. Hipertensión por carga de volumen	10
V.II. Hipertensión por vasoconstricción	10
V.III. Hipertensión mixta: vasoconstricción-volumen	11
VI. Hipertensión vasculorrenal 2 riñones-1 clip	12
VII. Hipertensión por inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico	20
VII.1. Óxido nítrico.....	20
VII.2. Déficit crónico de óxido nítrico.....	24
VIII. Péptido natriurético auricular	30
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	41
I. Animales de experimentación	41
II. Hipertensión vasculorrenal 2 riñones-1 clip.....	41
III. Hipertensión arterial por inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico	42
IV. Determinaciones hemodinámicas	43
V. Determinación del volumen sanguíneo	45
VI. Protocolos experimentales	47

1. Efectos hemodinámicos de la saralasinina	47
2. Efectos hemodinámicos del losartán.....	47
3. Efectos hemodinámicos del péptido natriurético auricular	48
4. Efectos hemodinámicos del PNA en animales pretratados con saralasinina	49
5. Efectos hemodinámicos de la saralasinina en animales pretratados con PNA	49
6. Efectos hemodinámicos del PNA en animales pretratados con losartán	50
7. Efectos hemodinámicos del PNA en animales tratados crónicamente con losartán	51
VII. Comprobación del grado de bloqueo de los receptores de angiotensina	52
VIII. Métodos estadísticos	52
RESULTADOS	53
Protocolo 1. Efectos hemodinámicos de la saralasinina	53
Protocolo 2. Efectos hemodinámicos del losartán	58
- Comparación de los efectos de la saralasinina y losartán	61
Protocolo 3. Efectos hemodinámicos del péptido natriurético auricular	63
Protocolo 4. Efectos hemodinámicos del PNA en animales pretratados con saralasinina.....	66
Protocolo 5. Efectos hemodinámicos de la saralasinina en animales pretratados con PNA	70
Protocolo 6. Efectos hemodinámicos del PNA en animales pretratados con losartán	73
Protocolo 7. Efectos hemodinámicos del PNA en animales tratados crónicamente con losartán	76
- Comparación de los efectos del PNA en los diferentes grupos experimentales	80
- Comprobación del grado de bloqueo de los receptores de angiotensina	82
DISCUSIÓN	83
SUMARIO DE RESULTADOS	97
CONCLUSIONES	99

BIBLIOGRAFÍA.....100

ABREVIATURAS

- aa, aminoácido.
- AII, angiotensina II.
- ARP, actividad de renina plasmática.
- ECA, enzima de conversión de la angiotensina.
- FC, frecuencia cardíaca.
- FSR, flujo sanguíneo renal.
- GC, gasto cardíaco.
- GMPc, monofosfato de guanosina cíclico.
- Hto, hematocrito.
- IC, índice cardíaco.
- IRPT, índice de resistencias periféricas totales.
- IVS, índice de volumen sistólico.
- IECA, inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina.
- IVS, índice de volumen sistólico.
- L-NAME, N^w-nitro-L-arginina metil éster.
- NO, óxido nítrico.
- PA, presión arterial.
- PAM, presión arterial media.
- PG, prostaglandina.
- PGI₂, prostaciclina.
- PMLLC, presión media de llenado circulatorio.
- PNA, péptido natriurético auricular.
- RPT, resistencias periféricas totales.
- RVR, resistencia vascular renal.

- SNC, sistema nervioso central.
- SNS, sistema nervioso simpático.
- SRA, sistema renina angiotensina.
- TFG, tasa de filtrado glomerular.
- VS, volumen sistólico.
- 2R-1C, 2 riñones-1clip.

INTRODUCCIÓN

I. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL.

La presión arterial (PA) no se encuentra regulada por un único mecanismo sino por varios sistemas interrelacionados que realizan funciones específicas de control. Éstos pueden ser divididos en tres grupos dependiendo del tiempo que tardan en reaccionar tras un cambio en los niveles de PA.

1) Mecanismo de regulación rápida: se encuentra formado fundamentalmente por reflejos nerviosos agudos u otras respuestas neurógenas. Todos ellos comienzan a actuar inmediatamente y son muy poderosos. Dentro de este grupo se pueden incluir:

- 1.a Sistema de receptores de alta presión o barorreceptores.
- 1.b Sistema de receptores de baja presión.
- 1.c Respuesta isquémica del Sistema Nervioso Central (SNC).
- 1.d Mecanismo de los quimiorreceptores.

2) Mecanismos de regulación de actuación intermedia que comienzan a ser activos sólo algunos minutos tras la aparición de una modificación aguda de la PA. Son:

- 2.a La vasoconstricción inducida por el sistema renina-angiotensina (SRA).
- 2.b La relajación de los vasos inducida por el estrés.
- 2.c El mecanismo de traslocación de los líquidos capilares.

Estos tres mecanismos empiezan a ser importantes en un intervalo comprendido entre 30 minutos a varias horas. Su efecto puede ser mantenido durante algunos días si es preciso. La importancia de estos mecanismos intermedios de regulación de la PA es mayor en cuanto que el sistema nervioso en este tiempo ha empezado a fatigarse y es menos efectivo.

3) Mecanismo de regulación a largo plazo, es decir, días, meses o años. Lo constituye el riñón y su característica de *ganancia infinita* y sus relaciones con el sistema renina-

angiotensina-aldosterona en el control de los líquidos corporales (Guyton, 1988).

No obstante la interrelación existente entre todos los sistemas que regulan la PA, con un interés didáctico se puede simplificar el control de la PA en regulación nerviosa, regulación humoral y regulación renal.

II. REGULACIÓN NERVIOSA

1.- Sistema de receptores de alta presión o barorreceptores. Lo constituyen una red especializada de receptores localizados en el seno carotídeo y en el arco aórtico. La respuesta ante variaciones en la PA es inmediata (segundos) y muy potente. Pero el efecto compensador de los barorreceptores es sólo parcial y, si la causa de la variación se mantiene, se adaptan. Diferentes investigadores han demostrado que este reajuste de los barorreceptores se produce entre las 24 y 48 horas siguientes a su activación (Romero y cols., 1993).

2.- Sistema de receptores de baja presión. En el corazón y los pulmones existe una extensa red de receptores de estiramiento cuyas fibras, mielínicas y amielínicas, se encuentran incluidas en los nervios simpáticos cardíacos y el nervio vago. Estos receptores detectan las variaciones de la PA como respuesta a los cambios del volumen circulatorio y median las respuestas adaptativas renales y vasculares adecuadas a través de:

a) La excreción de sal y agua en el riñón. La distensión de las aurículas produce una dilatación refleja de las arteriolas aferentes de los riñones incrementando la filtración de líquido hacia los túbulos renales y una rápida pérdida de líquido por la orina, devolviendo el volumen sanguíneo hacia valores normales. Ésto se consigue por una inhibición de los nervios simpáticos eferentes renales y de la secreción de vasopresina (Goetz y cols., 1975).

b) La distribución de líquidos entre el compartimiento intersticial y el intravascular, mediado por un cambio en el tono arterial precapilar, permitiendo que los cambios de la presión hidrostática se transmitan al territorio capilar de determinados lechos vasculares.

Aquí se pone de manifiesto una diferencia muy importante entre el modo de operar del sistema de receptores de alta y baja presión. El cambio del tono simpático mediado por los barorreceptores arteriales se generaliza a todos los territorios vasculares, por lo que afecta a la

resistencia periférica total y la PA. Por el contrario, el cambio del tono simpático mediado por los receptores cardiopulmonares sólo afecta a los territorios vasculares que tienen poco efecto sobre la resistencia periférica total, aún cuando produzca un movimiento importante de líquido entre los compartimientos vasculares (Romero y cols.,1993).

c) Secreción de agentes humorales que participan en el control del volumen: fundamentalmente renina, prostaglandinas y hormona antidiurética.

3.- Respuesta isquémica del Sistema Nervioso Central. Se pone en marcha cuando el centro vasomotor localizado en el tallo encefálico sufre una reducción del flujo lo bastante grande para causar carencia nutricional. La excesiva concentración de dióxido de carbono, el ácido láctico y otras sustancias ácidas estimulan una potente vasoconstricción simpática generalizada. Un tipo especial de respuesta isquémica del SNC es la llamada *reacción de Cushing* que se desencadena cuando un aumento excesivo de la presión intracraneal comprime las arterias cerebrales poniendo en riesgo el flujo sanguíneo cerebral.

4.- Mecanismo de los quimiorreceptores. *Los cuerpos carotídeos y los cuerpos aórticos* poseen células quimiosensibles que detectan disminuciones de la PA por la disponibilidad reducida de oxígeno y elevada concentración de dióxido de carbono e iones hidrógeno. Su respuesta a través del centro vasomotor es elevar la PA.

III. REGULACION HUMORAL.

III.1. AGENTES VASOCONSTRICTORES.

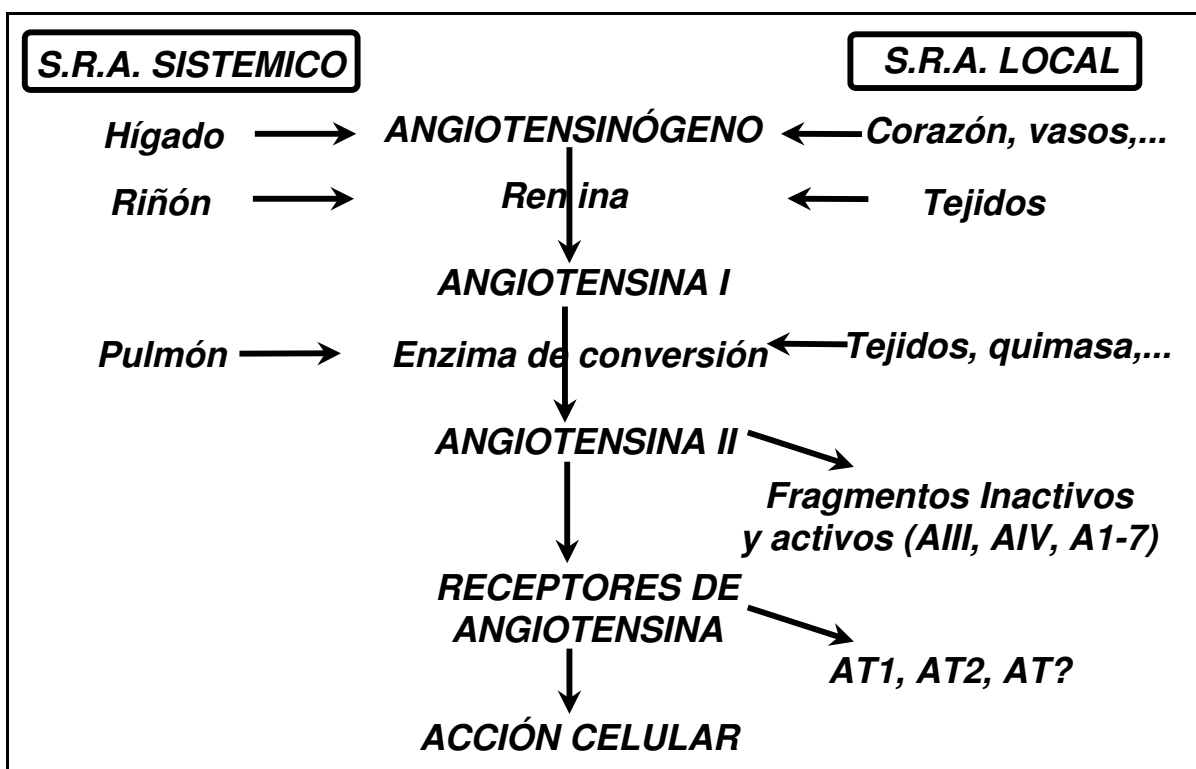
III.1.A. Adrenalina y noradrenalina.

Cuando se estimula el Sistema Nervioso Simpático (SNS) no sólo se provoca la activación nerviosa directa de los vasos y el corazón, sino que también se induce la secreción de

adrenalina y noradrenalina por la médula suprarrenal. Éstas pasan a sangre y ejercen los mismos efectos que las liberadas en las terminaciones simpáticas, con la ventaja de que tienen una acción más prolongada (permanecen en sangre de uno a tres minutos antes de ser destruidas) y llegan a zonas que carecen de inervación simpática como las metaarteriolas.

III.1.B. Vasopresina.

La vasopresina u hormona antidiurética, secretada en la neurohipófisis, interviene en la regulación de la PA a través de dos mecanismos: una potente actividad vasoconstrictora que se pondría de manifiesto en situaciones de descenso brusco de la PA y un efecto renal, a nivel de túbulo colector, de reabsorción de agua fundamentalmente.



III.1.C. Angiotensina II (AII).

Es el producto final de una reacción multienzimática que tiene lugar en sangre y en determinados tejidos (figura 1). Las células mioepiteliales de la arteriola aferente que forma parte

del aparato yuxtaglomerular secretan *renina* en respuesta a diferentes estímulos: disminución de la presión de perfusión renal, disminución de la carga tubular de NaCl, activación del SNS, etcétera. La *renina*, enzima proteolítico, actúa sobre el angiotensinógeno, alfa-2-glicoproteína sintetizada por el hígado, separa uno de sus extremos y libera un decapeptido, la *angiotensina I*. Sobre ésta actúa el *enzima de conversión de la angiotensina* (ECA) separando dos aminoácidos (aa). Esta reacción tiene lugar casi por completo en los pequeños vasos pulmonares ya que la enzima se encuentra en sus paredes vasculares. El octapeptido generado se denomina *AII* y es la hormona más activa del sistema. La *AII* es el sustrato de una *aminopeptidasa* que origina la *angiotensina III* (Des-aspartil angiotensina II o angiotensina [2-8]), con menos efectos presores y un papel menos importante en la regulación de la hemodinámica renal que la *AII*, pero igual de potente para estimular la síntesis y liberación de *aldosterona* por la glomerulosa adrenal (Hall y cols, 1979).

El sistema genera otros péptidos con diferente actividad biológica, angiotensina [3-8] o angiotensina IV y angiotensina [1-7] que se forma tanto de la angiotensina I como de la *AII* y podría tener un papel en la secreción renal de prostaglandinas (Smith y Timmermans, 1994) y en la modulación de las interacciones célula a célula en los tejidos nervioso y cardiovascular (Ferrario y cols., 1991). No obstante, el principal efector de todo el sistema es la *AII*, por ello actualmente existe la tendencia de sustituir el nombre de *sistema renina-angiotensina* por el de *sistema angiotensina* (Smith y Timmermans, 1994). La *AII* ejerce sus funciones uniéndose a un receptor específico, denominado receptor AT. Éste se subdivide en *receptor AT1*, que es selectivamente inhibido por los bifenilimidazoles tipificados por el DuP753 o losartán y *receptor AT2*, inhibido selectivamente por las tetrahydroimidazopiridinas tipificadas por el PD 123177 (Bumpus y cols., 1991). Mientras que el *AT1* media los efectos mejor conocidos de la *AII* como vasoconstricción, secreción de aldosterona, sed, facilitación de la secreción de noradrenalina e

inhibición de la secreción de renina, se desconoce cual es la función del receptor AT2 (Smith y Timmermans, 1994).

El SRA se puede bloquear en múltiples puntos de la cascada enzimática: (a) inhibidores de la síntesis de angiotensina: inhibidores de renina o inhibidores de la ECA (IECA) (captopril, enalapril); (b) anticuerpos frente a la AII; (c) moduladores de la afinidad del receptor: ditiotreitól (DTT), guanosina 5'-O-(5-tiofosfato); (d) anticuerpos que compiten por el receptor; (e) antagonistas peptídicos del receptor (saralasin); (f) antagonistas no-peptídicos del receptor (losartán).

La AII participa en el control del volumen de líquido extracelular y de la PA a través de acciones sobre el aparato circulatorio y sobre el riñón. Las acciones más importantes sobre el aparato circulatorio son: (a) la AII es un potente constrictor de los vasos de resistencia, este efecto se debe a la actuación sobre receptores específicos AT1 de la célula muscular lisa vascular; (b) tiene efectos presores estimulando la actividad simpática a nivel de SNC; (c) estimula la secreción de vasopresina y ACTH y provoca sed y apetito de sal; (d) estimula la liberación de catecolaminas por la médula adrenal y facilita la transmisión adrenérgica, aumentando la secreción del neurotransmisor e inhibiendo su recaptación presináptica; (e) inhibe la actividad del barorreflejo actuando a nivel del núcleo del tracto solitario; (f) produce vasoconstricción, aumenta el tono venoso y el gradiente para el retorno venoso, aumenta la precarga y permite que el gasto cardíaco (GC) se mantenga a pesar del incremento en la postcarga que produce por sus efectos sobre las resistencias periféricas. En situaciones fisiológicas normales la angiotensina juega un papel mínimo en el control de la PA a través de sus acciones circulatorias, sin embargo sí tiene un papel fundamental en el control de la función renal tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. De hecho, la concentración intrarrenal de AII es mil veces superior a la plasmática y cuando ésta se eleva por encima del rango fisiológico produce un aumento de la

presión arterial que induce diuresis y natriuresis, efectos opuestos a los que en condiciones normales provoca la angiotensina II, que es antidiurética y antinatriurética (Plath, 1990).

III.1.D. Endotelina (ET).

Es un péptido de 21 aa. y está considerada como la sustancia endógena con mayor potencia vasoconstrictora. Se han aislado tres isopéptidos, ET-1, ET-2, ET-3 que aunque se diferencian en algunos aminoácidos, presentan la misma secuencia en el hexapéptido C-terminal. La ET-2 es la de mayor potencia vasoconstrictora. La ET procede de una molécula precursora, la preproendotelina, que tras una serie de excisiones por la acción de una endopeptidasa y la enzima convertidora de endotelina la transforman en proendotelina y ET. Su síntesis está regulada por estímulos como trombina, AII, vasopresina, ionóforo de calcio, ésteres de forbol, fuerzas de rozamiento, hipoxia, etc.. Su mecanismo de acción está mediado por un aumento del calcio citosólico procedente de los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico. Actúa a través de receptores específicos ET_A y ET_B que se encuentran distribuidos ampliamente por los diferentes órganos. Los ET_A se encuentran en las células del músculo liso y median la vasoconstricción y los ET_B se encuentran principalmente en las células endoteliales donde producen la liberación de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI_2) induciendo vasodilatación. A nivel renal la ET aumenta las resistencias vasculares renales (RVR) y disminuye el flujo sanguíneo renal (FSR); los efectos sobre la tasa de filtrado glomerular (TFG) son variables. A nivel vascular produce, tras su infusión en animales vivos, un efecto en dos etapas: una acción vasodilatadora sistémica con hipotensión en un primer momento debido a una estimulación de la liberación de NO y PGI_2 , a una inhibición de la liberación de noradrenalina en las terminaciones nerviosas periféricas y a un aumento de la secreción del péptido natriurético auricular (PNA). Después de la fase hipotensora la ET produce un aumento dosis-dependiente de la PA por una fuerte vasoconstricción sistémica con reducción del GC y aumento de las resistencias periféricas totales (RPT) (Lahera y Romero,

1993).

III.1.E. Factores constrictores derivados del endotelio (FCDE).

Además de la ET, el endotelio produce otros agentes vasoconstrictores que genéricamente se les denomina FCDE. Dichos factores podrían ser radicales libres que inactivarían por oxidación el NO reduciendo el tono vasodilatador basal, o algunos derivados del ácido araquidónico. No se conoce con exactitud su naturaleza ni su significación cardiovascular, sin embargo la vasoconstricción dependiente del endotelio evocada por la hipoxia o por aumentos de la presión transmural parece contribuir a la respuesta fisiológica provocada por estos fenómenos (Lahera y Romero, 1993).

III.2 AGENTES VASODILATADORES.

III.2.A. Sistema calicreína-cininas.

El sistema calicreína-cininas es un complejo sistema enzimático cuyos principales componentes son la enzima calicreína, el sustrato cininógeno, las hormonas efectoras o cininas (lysil-bradicinina y bradicinina), las enzimas degradadoras o cininasas (cininasa I, cininasa II o ECA, endopeptidasa neutra 24.11, endopeptidasa 24,15) y un número aún indeterminado de activadores e inhibidores de calicreína y cininasas. Algunos de sus efectos renales son: produce una vasodilatación renal mediada por prostaglandinas y por factores relajantes derivados del endotelio, aumenta el flujo sanguíneo renal (FSR) y papilar, produce diuresis, natriuresis y kaliuresis, inhibe en el túbulo colector la permeabilidad al agua mediada por vasopresina/ADH, induce la secreción de renina. A nivel vascular produce vasodilatación con disminución de la postcarga (Vío, 1993).

III.2.B. Prostaglandinas (PGs).

Las prostaglandinas se sintetizan a partir del ácido araquidónico por actuación de la

enzima ciclooxigenasa. Algunos de los productos resultantes son vasoconstrictores, como el tromboxano A_2 , otros vasodilatadores, como la PGE_2 o la prostaciclina o PGI_2 . Además de este efecto vasodilatador la PGE_2 es diurética y natriurética. La PGI_2 se sintetiza fundamentalmente en el endotelio vascular mediante la acción del complejo enzimático ciclooxigenasa- PGI_2 sintetasa. Se libera a nivel extracelular actuando localmente sobre las plaquetas y las células musculares lisas de la pared vascular inhibiendo la activación y agregación plaquetaria y produciendo vasorrelajación. No se almacena en la célula sino que es sintetizada en respuesta a numerosos estímulos como rozamiento (shear stress), AII, acetilcolina, bradicinina (Lüscher y Dubey, 1995)

III.2.C. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE).

El endotelio libera un factor denominado FHDE que produce vasorrelajación a través de una hiperpolarización de las células musculares lisas vasculares. La hiperpolarización podría ser debida a la activación de canales de K^+ sensibles a ATP y/o canales de Na^+/K^+ sensibles a ATP. La relajación provocada por la acetilcolina dependiente del FHDE es transitoria mientras que la dependiente del NO es mantenida. Ambas son producidas por mecanismos diferentes, mientras que la liberación de FHDE está mediada por la activación de los receptores M_1 la del NO lo está por los receptores M_2 . Aunque no se conoce bien su naturaleza se ha sugerido que podría ser un metabolito lábil derivado del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa o de la citocromo P-450 (Lüscher y Dubey, 1995).

III.2.D. Óxido nítrico (NO).

Se expondrá con amplitud más adelante al hablar de la hipertensión por déficit crónico de NO.

IV. REGULACIÓN RENAL

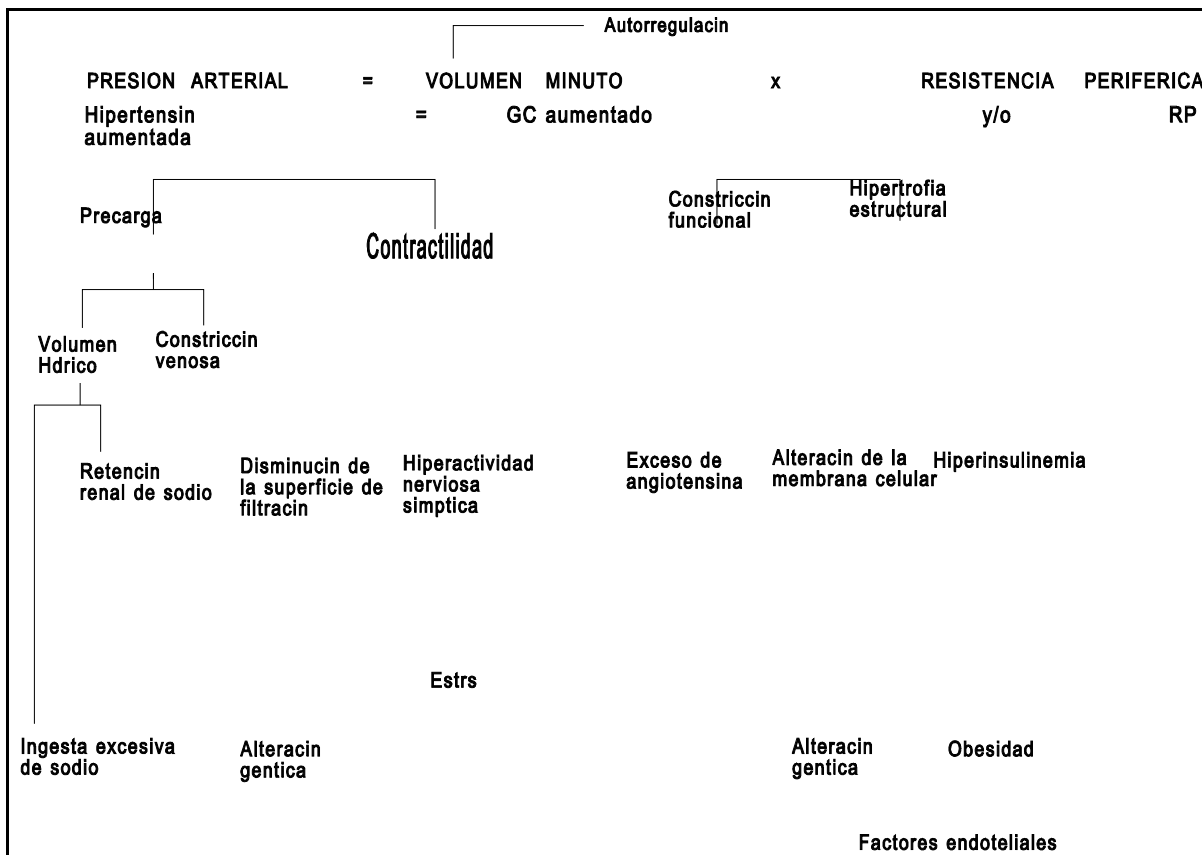
Los mecanismos de control nervioso y humoral son muy rápidos y efectivos, sin embargo

su capacidad reguladora pierde eficacia pasado un cierto tiempo. Pese a ello la PA es una variable que se mantiene siempre dentro de unos límites muy controlados. Esto es posible gracias al riñón y a la regulación del volumen de líquido extracelular, que constituye el mecanismo más importante para la regulación de la PA a largo plazo. Cuando la PA se eleva por encima de los niveles normales los riñones responden con un aumento de la diuresis y natriuresis, las denominadas *diuresis y natriuresis de presión*. Se consigue así disminuir el volumen de líquido extracelular, el volumen sanguíneo, el retorno venoso, el GC y normalizar la PA. El aumento de la PA incrementa la presión de perfusión renal y esto induce una reducción de la reabsorción tubular de sodio y agua mediado por una inhibición de la secreción de renina, disminución de la formación de AII y aldosterona. Todo ello se produce sin alterar el FSR total y la TFG por el funcionamiento de la *autorregulación renal* y el *feedback tubuloglomerular*.

El sistema riñón-líquidos corporales para el control de la PA está estrechamente ligado con la ingesta y excreción de agua, de forma que, en la *curva de función renal*, la presión de equilibrio (aproximadamente 100 mmHg) corresponde al valor de la PA donde la excreción renal de líquido es exactamente igual a la ingesta. Si la PA es superior a la presión de equilibrio la excreción es mayor que la ingesta y el volumen extracelular se reduce disminuyendo la PA. Si la presión de equilibrio se desplaza a un nuevo punto de presión, a largo plazo se instalará un nuevo nivel de PA. Existen dos formas por las que puede situarse la PA en un nivel superior: (a) el desplazamiento de la curva de función renal hacia la derecha, con lo que el punto de intersección en el que se igualan la ingesta y la excreción está situado a un nivel de presión más alto y (b) el aumento del aporte de sodio, con lo que ingesta es superior a la excreción y el punto de intersección también se sitúa en niveles de presión más altos (presión de equilibrio \approx 100 mmHg) (Guyton y cols., 1974; Romero y cols., 1993).

V. HIPERTENSIÓN: MODELOS BÁSICOS.

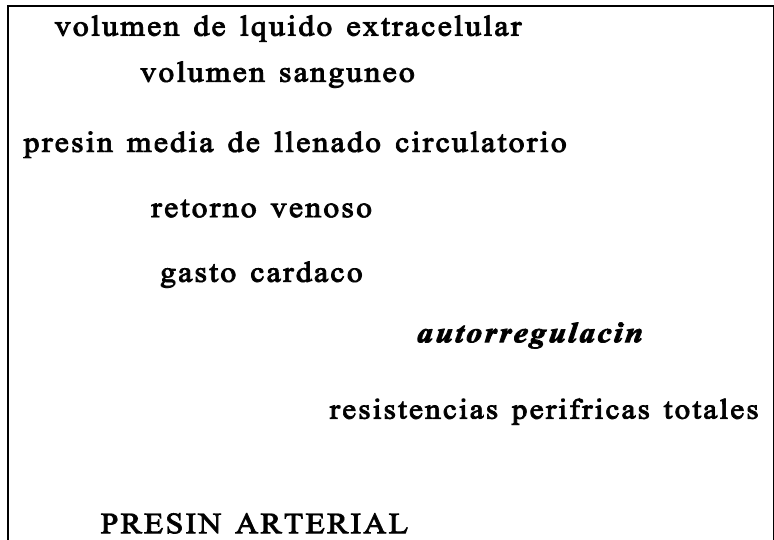
La fórmula básica de la PA, que deriva de la *ley de Ohm*, establece que la PA está determinada por el GC y las RPT. Sobre los dos miembros de esta ecuación pueden influir multitud de factores que en último término van a determinar los valores de la PA (figura 2).



V.I. HIPERTENSIÓN POR CARGA DE VOLUMEN.

Se produce cuando se acumula un volumen excesivo de líquido extracelular. Los ejemplos típicos son la hipertensión experimental DOCA-sal (Dahl, 1972) y la causada por la reducción de la masa renal simultáneamente con un aumento de la ingestión de sal (Koletsky y Goodsitt, 1960). Se desarrolla en dos etapas. En la primera, la hipertensión se produce por el

aumento del volumen de líquido extracelular, volumen sanguíneo y GC ya que las RPT disminuyen. En una segunda etapa la hipertensión es mantenida por las RPT dado que el volumen sanguíneo y el GC casi se normalizan. La pérdida de volumen de líquido extracelular se debe a que el incremento de las resistencias arteriolas disminuye la presión hidrostática capilar y el líquido tisular vuelve a sangre y el incremento en la PA induce diuresis y natriuresis de presión. Las RPT aumentan por el mecanismo de la *autorregulación* (Cowley, 1980). Este mecanismo se ilustra en la figura 3.



V.II. HIPERTENSIÓN POR VASOCONSTRICCIÓN.

Se produce por la administración continua de un agente vasoconstrictor o por la secreción excesiva de éste por una de las glándulas endocrinas que los sintetizan. Los vasoconstrictores que pueden producir este tipo de hipertensión arterial son AII, noradrenalina y adrenalina. Las situaciones en las que se puede presentar son la infusión continua intravenosa de AII, tumor secretor de renina y feocromocitoma. El potente efecto que tiene la AII para contraer las arteriolas produce un aumento importante de las RPT, responsable de la hipertensión arterial. El volumen sanguíneo se reduce ligeramente debido al pequeño efecto venoconstrictor de la AII y a

la diuresis y natriuresis provocada por la presión elevada. Aunque ésto pueda coadyuvar, la fuerte reducción del GC se debe a la intensa vasoconstricción arteriolar que reduce el retorno venoso. La vasoconstricción arteriolar también tiene lugar en el riñón y ésto desvía la curva de excreción renal hacia límites de presión más altos, por lo que el incremento de presión se prolonga en el tiempo. De lo contrario, la misma presión elevada normalizaría la presión por el mecanismo de diuresis y natriuresis de presión (Granger y cols., 1990).

V.III. HIPERTENSIÓN MIXTA: VASOCONSTRICCIÓN-VOLUMEN.

Es raro encontrarse con una hipertensión en la que sólo uno de los dos componentes del binomio vasoconstricción-volumen o RPT-GC sea el responsable de los niveles elevados de presión. Lo más frecuente es que sea mixta y que ambas variables participen, como sucede en la hipertensión vasculorrenal 1 riñón-1 clip. En ella se extirpa un riñón y en la arteria renal del otro se coloca un clip reduciendo el FSR y la presión de perfusión. Se activa la secreción de renina y los niveles de AII plasmáticos se incrementan para aumentar la PA y mantener la perfusión renal dentro de los rangos normales. La AII produce una vasoconstricción arteriolar importante. Al mismo tiempo, la AII aumenta la secreción de aldosterona y vasopresina y estimula el centro de la sed. Se va produciendo una retención de agua y sodio a nivel renal y un aumento de ingesta de agua que aumentan el volumen sanguíneo. Se produce un incremento del GC y de la PA. Cuando la presión de perfusión se normaliza, disminuye la actividad de renina plasmática (ARP) hasta normalizarse. Durante las semanas siguientes se produce una disminución del volumen sanguíneo y del GC por la diuresis de presión pero la PA sigue elevada, a expensas de unas RPT altas, por el mecanismo de autorregulación explicado antes (Bianchi y cols.,1970). Se puede decir que la hipertensión mixta pasa por tres etapas: vasoconstricción arteriolar, aumento de volumen y autorregulación.

Muchos tipos de hipertensión pueden englobarse en este modelo: hipertensión vasculorrenal 2 riñones-1 clip, hipertensión de la toxemia del embarazo, hipertensión neurógena, hipertensiones espontáneas o genéticas, etcétera.

VI. HIPERTENSION VASCULORRENAL 2 RIÑONES-1CLIP (2R-1C)

Aunque en 1909 Janeway ya había observado elevaciones de la PA en perros a los que se les colocaba ligaduras alrededor de las arterias renales, fue en 1934 cuando Goldblatt ideó este modelo de hipertensión en perros. Wilson y Byrom, en 1939, desarrollaron el mismo modelo de hipertensión en la rata (Ploth, 1983).

Este modelo de hipertensión, denominado hipertensión Goldblatt, es importante porque remeda experimentalmente la hipertensión producida por la estenosis de una arteria renal en humanos, pero la amplitud de su significado la encontramos en el hecho de que su estudio supuso el inicio del conocimiento de los mecanismos que intervienen en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial.

La cadena de acontecimientos fisiopatológicos se inicia con la colocación de un clip alrededor de una arteria renal y la inmediata reducción del FSR. A partir de aquí la hipertensión evoluciona y es mantenida a lo largo del tiempo por diferentes mecanismos. Para Martínez-Maldonado (1991), la evolución de la hipertensión renovascular puede dividirse en tres etapas: la *fase I*, que ocupa las cuatro primeras semanas tras el clipado, depende fundamentalmente del SRA y cursa con altos niveles de ARP y AII; la *fase II*, desde la quinta a la novena semana, es una fase de retención de sal, con volumen sanguíneo y plasmático aumentado, con ARP y AII disminuidas, pero con un incremento de sensibilidad a la AII exógena, indicando una down-regulation de los receptores de AII; la *fase III*, a partir de la novena semana, con bajos niveles de ARP y AII, donde la eliminación del clip no devuelve la presión a valores normales y para conseguirlo son necesarias dosis de IECA superiores a las usadas en las fases I o II. Veremos a continuación los principales factores implicados en este tipo de hipertensión.

VI.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.

El incremento de la PA es provocado por un aumento de la secreción de renina en el riñón

isquémico, a causa de la brusca disminución en la presión de perfusión. Ésto produce un aumento de la concentración plasmática de AII para intentar corregir la caída de perfusión renal. El SRA actúa en pocos minutos y su activación puede ser puesta de manifiesto midiendo la concentración de alguno de sus componentes o por la disminución de la presión inducida por antagonistas de la AII o IECA. El bloqueo crónico del SRA con un IECA o con un antagonista de los receptores AT1 previene el desarrollo de esta forma de hipertensión experimental y, en ratas con hipertensión renal establecida, la administración aguda de IECA o antagonistas de los receptores AT1 (saralasin o losartán) disminuye de forma importante los niveles de PA (Imamura y cols., 1995).

El aumento de la PA va acompañado de un incremento de la diuresis y natriuresis a través del riñón contralateral, constituyendo éste una vía de escape para eliminar, al menos parcialmente, el aumento de volumen. Para evitar que se produzca una pérdida excesiva de líquido y sales, el riñón intacto tiene que modificar su función y ésto lo hace influenciado por los altos niveles de AII en plasma. La AII cumple, por lo tanto, dos objetivos: aumentar la PA para normalizar el grado de perfusión del riñón isquémico y mantener los niveles de agua y electrolitos mediante la reabsorción en el riñón contralateral, aumentando la concentración de aldosterona por la corteza suprarrenal y desviando hacia la derecha la curva de presión-diuresis. Si la presión disminuye, aumenta la secreción de renina y el volumen sanguíneo. Si la presión aumenta, la renina disminuye y el riñón cotralateral elimina parte del volumen retenido hasta que se vuelve a alcanzar de nuevo el equilibrio de volumen/presión (Cowley y cols.,1981). Este balance minucioso entre los niveles de PA necesarios para la perfusión de ambos riñones se hace más precario conforme aumenta la severidad de la hipertensión, hasta un valor crítico de 180 mmHg, momento en que se produce una pérdida de líquido a través del riñón contralateral, disminuye el volumen sanguíneo, aumenta la secreción de renina y se incrementa todavía más la

PA (Mohring y cols.,1975).

Además de los efectos de la AII circulante, el incremento en la producción de AII en las paredes vasculares también puede afectar la reactividad vascular o ejercer un efecto presor directo sin necesidad de elevados niveles de AII plasmática. La renina y la actividad de la ECA vascular están aumentadas en la hipertensión 2R-1C y tras la nefrectomía bilateral la renina plasmática se reduce rápidamente mientras que la renina vascular lo hace lentamente, en la misma medida que la presión arterial (Thurston y cols., 1979).

Se ha propuesto un aumento de la reactividad vascular de los animales hipertensos renales a la AII como responsable del mantenimiento de los altos niveles de presión cuando las concentraciones de AII no están elevadas. Los resultados dependen del tipo de experimento. In vitro, anillos de aorta presentan una mayor reactividad a la AII y en el animal vivo parece que hay una hiporrespuesta a la AII exógena cuando los niveles plasmáticos de AII están elevados. Esto podría explicarse por la modulación que la AII ejerce sobre sus receptores, de forma que cuando está elevada hay una menor sensibilidad o menor número de receptores y cuando está disminuida hay una mayor cantidad o sensibilidad de los mismos (Edmunds y cols., 1991).

Además del SRA intervienen otros factores en el origen y mantenimiento de la hipertensión 2R-1C.

VI.2. SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO Y NERVIOS RENALES.

En el modelo de hipertensión 2R-1C parece que el sistema nervioso no participa en el desarrollo pero sí en el mantenimiento. Cuando la AII se administra intracerebroventricularmente produce un aumento de la PA mediada por una activación del SNS. La AII circulante tiene acceso a núcleos centrales implicados en la regulación cardiovascular a través de áreas exentas de barrera hemato-encefálica y puede, de esta forma, mediar un incremento de la actividad nerviosa simpática. A nivel periférico la AII facilita la liberación de

noradrenalina de las terminaciones nerviosas simpáticas y tiene un efecto inhibitorio sobre su recaptación presináptica. La AII incrementa la respuesta contractil de la vasculatura a la noradrenalina. Finalmente la AII puede modular la respuesta del barorreflejo sinoaórtico (Berenguer y cols., 1991; Niederberger y cols., 1995). Por todo ello, en la hipertensión vasculorrenal 2R-1C se ha observado que el tono simpático está aumentado y la denervación renal mejora la hipertensión, y aunque los niveles de noradrenalina plasmáticos no están aumentados se piensa que existe un estado de hipersensibilidad o aumento de la afinidad de los receptores adrenérgicos, ya que la administración de norepinefrina exógena provoca una respuesta mayor que en animales controles.

La actividad nerviosa simpática eferente renal está aumentada y por lo tanto sus efectos sobre la resistencia vascular renal (RVR), la retención de agua y sodio, el incremento en la secreción de renina, catecolaminas y otras sustancias vasoactivas. Por otro lado, la alteración del reflejo reno-renal inhibitorio desde el riñón clipado puede aumentar la actividad nerviosa simpática eferente y contribuir de esta manera al mantenimiento de la hipertensión 2R-1C (Kopp y Buckley-Bleiler, 1989).

VI.3. SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS.

En las fases iniciales de la hipertensión Goldblatt, la calicreína está aumentada oponiéndose a las acciones antidiuréticas y vasoconstrictoras del SRA. En las fases avanzadas, la excreción de calicreína y su síntesis renal están disminuidas contribuyendo de esta forma al mantenimiento de la hipertensión (Martinez-Maldonado,1991). Von Thun y cols.(1994) no encontraron alterada la expresión de genes de calicreína en riñones de ratas hipertensas de 2 semanas, sugiriendo que la ausencia de un aumento en su síntesis ayudaba al mantenimiento de la hipertensión 2R-1C porque no contrabalanceaban el incremento de la AII.

VI.4. VASOPRESINA.

No es necesaria para el desarrollo de la hipertensión 2R-1C, pero una vez establecida sus niveles plasmáticos están aumentados y podría contribuir a algunos de los cambios hemodinámicos. De hecho, podría ser responsable parcialmente del mantenimiento de presiones glomerulares altas en el riñón no-clipado. Ichikawa y cols.(1983) usando antagonistas específicos de la AVP consiguieron una vasodilatación periférica pero no de las arterias renales. Ésto produjo una disminución de la presión arterial, de la presión hidrostática capilar glomerular, flujo plasmático renal y TFG individual en el riñón no-clipado. Además de demostrar que la AVP interviene en el mantenimiento de presiones glomerulares e índices de flujo altos en el riñón no-clipado de animales con hipertensión Goldblatt, también demuestra la existencia de un control de autorregulación defectuoso en el riñón no-clipado.

VI.5. PROSTAGLANDINAS.

Cuando se administra indometacina, inhibidor de la ciclooxigenasa y, por lo tanto, de la síntesis de prostaglandinas, a conejos 2R-1C, éstos responden con un incremento progresivo de la creatinina plasmática, ARP, oliguria, disminución del FSR y TFG y desarrollo de hipertensión maligna (Romero y Strong ,1977). Cangiano y cols.,1978 demostraron un gran índice de mortalidad en ratas hipertensas 2R-1C tratadas con indometacina debido al recrudecimiento de la severidad de la hipertensión. Esto demuestra la función protectora que ejercen las prostaglandinas sobre la circulación renal.

VI.6. TROMBOXANOS.

El riñón contralateral aislado y perfundido de ratas 2R-1C produce grandes cantidades de tromboxano, pero no de prostaciclina. Este incremento en la producción de tromboxanos es directamente proporcional a la reducción en la TFG. El tratamiento con inhibidores de la síntesis de tromboxanos o antagonistas de los receptores de tromboxanos aumenta la TFG en el riñón no clipado y disminuye la PA sistémica. Ésto indica que un aumento en la síntesis de tromboxanos

puede tener acciones intrarrenales y sistémicas que contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión 2R-1C (Himmelstein y Klotman, 1989).

VI.7. SISTEMA VASODEPRESOR DE MÉDULA RENAL.

Las células intersticiales de médula renal de perros normales y 2R-1C secretan sustancias vasodilatadoras lipídicas no-prostanoides. La medulectomía química empeora la hipertensión e impide la disminución de la PA tras el desclipaje. Las modificaciones de la PA tras la deconstricción están en función del daño medular, es decir, que la recuperación de la PA normal depende en parte de los lípidos medulares vasodilatadores. Es posible que la secreción de lípidos medulares se haga por el riñón contralateral ya que la disminución de las RPT se produce tanto con el desclipaje como con la eliminación del riñón isquémico. Es posible que la señal para la secreción de lípidos sea la disminución de la concentración de AII circulante, existiendo un feedback entre la AII y la secreción de lípidos medulares vasodepresores. Parece probable que el papel de los lípidos sea más importante en el periodo inmediatamente posterior al clipaje para determinar el grado de HTA (Edmunds y cols., 1991).

VI.8. FACTORES ENDOTELIALES.

En todas las formas de hipertensión arterial existe una respuesta dependiente del endotelio alterada, que podría ser causa o consecuencia del aumento de PA. Esto se sustenta en las siguientes observaciones: (a) secreción reducida de NO; (b) secreción reducida de otras sustancias vasodilatadoras dependientes del endotelio, como el FHDE o la PGI₂; (c) difusión deficiente de estas sustancias desde el endotelio a las células musculares lisas vasculares; (d) respuesta reducida de las células musculares lisas vasculares a las sustancias vasodilatadoras; (e) secreción aumentada de factores constrictores derivados del endotelio (Lüscher y Dubey, 1995).

En cultivos de células musculares lisas y de endotelio vascular, la AII ha demostrado ser un potente estimulador de la secreción de ET1. Ésta, a nivel vascular, actuaría amplificando los

efectos vasoconstrictores de la AII. En animales normotensos, una dosis de ET1 carente de efectos presores, potencia los efectos de una dosis no presora de AII, provocando un incremento de la PA (Yoshida y cols., 1992). Además Herizi y cols. (1998) han demostrado que el bosentan, un antagonista de los receptores de endotelina A y B, aunque no evita el incremento de la PA, sí previene los efectos cardiovasculares y renales que induce una infusión continua de AII. En la hipertensión vasculorrenal 2R-1C, con grandes cantidades de AII plasmática en sus fases iniciales, no está clara la participación de la ET1. Los niveles plasmáticos de ET inmunorreactiva en humanos con hipertensión vasculorrenal aparecen aumentados en unos estudios (Poch y cols., 1995) y en otros son completamente normales (Sorensen y cols., 1994). Li y cols.(1996), aunque encontraron altos niveles de mRNA de ET1 en vasos sanguíneos de ratas hipertensas 2R-1C, no observaron ningún efecto del bosentan ni sobre la PA, ni sobre el desarrollo de la hipertrofia vascular, como sí sucede en ratas hipertensas DOCA-sal.

No existen claras evidencias de la participación del NO en la hipertensión vasculorrenal 2R-1C. La estenosis de la arteria renal disminuye la perfusión renal y se produce un aumento de los niveles de AII plasmáticos y de la PA. La presión arterial aumentada provocaría un aumento del estrés de rozamiento, que es un estímulo para la síntesis de NO (Vanhoutte, 1989). Algunos autores han sugerido que los elevados niveles de NO durante la fase de desarrollo servirían para contrabalancear la vasoconstricción dependiente de la AII y mantener el flujo sanguíneo al riñón no clipado y al resto de los órganos (Sigmon y Beierwaltes, 1994). Así, Sigmon y Beierwaltes (1993) encontraron un incremento de la síntesis de NO en el riñón no clipado, presumiblemente relacionado con el shear stress, que mantendría la perfusión renal en ese riñón a pesar de los altos niveles de AII. Durante la fase crónica de la hipertensión 2R-1C el NO sigue contribuyendo con su actividad vasodilatadora a equilibrar la hipertensión y a mantener la perfusión en ambos riñones, clipado y no clipado, contrabalanceando una vasoconstricción independiente de la AII

(Sigmon y Beierwaltes, 1998). Sin embargo, en estas etapas la hipertensión está asociada con disfunciones endoteliales que pueden contribuir al predominio vasoconstrictor y a la PA elevada. Así, la respuesta vasodilatadora dependiente de NO de la arteriola aferente está disminuida en el riñón no clipado, mientras que la respuesta a nitroprusiato sódico está conservada (Ortenberg y cols., 1992).

VI.9. ALTERACIONES HEMODINÁMICAS.

La activación del SRA con aumento de los niveles plasmáticos de AII y aldosterona permite que, en las fases iniciales, la hipertensión curse con una elevación de las RPT y del GC. Ésto es debido a la acción vasoconstrictora de la AII sobre la vasculatura y a la retención de agua y sodio que generan la AII y la aldosterona. No obstante, el balance positivo de sodio no parece mantenerse a lo largo del tiempo y el GC volverá a la normalidad a pesar del mantenimiento de la hipertensión.

Carbonell y cols. (1983) observaron, 24 horas después de la colocación del clip, una hipertensión caracterizada por RPT aumentadas sin cambios en el GC, volumen sistólico (VS) o FC con un aumento de la AII plasmática. La ARP y los niveles de AII no permanecen elevados durante todo el desarrollo de la hipertensión, por lo que algunos autores (Cowley, 1980) han recurrido a la teoría de la autorregulación para explicar el mantenimiento de las RPT elevadas en presencia de un volumen circulante y GC normal o bajo.

Guyton y cols. (1974) piensan que un desequilibrio entre la capacidad del sistema circulatorio y el volumen que contiene podría ser causa de una permanente elevación de la PA. El balance positivo de sodio y agua que existe en los primeros momentos de la hipertensión podría inducir el incremento de sodio y agua en las paredes de los vasos de resistencia y alterar las propiedades contráctiles de su musculatura lisa (Tobian y cols., 1961).

De esta forma podría existir un estado de hipercontractilidad vascular por los altos niveles de AII

circulantes o por la activación del SRA tisular. Así, Inada y cols. (1988) encontraron un aumento de la actividad de la ECA tisular en ratas hipertensas 2R-1C.

Las alteraciones estructurales del sistema cardiovascular también pueden contribuir al mantenimiento de unas RPT elevadas: se produce una hipertrofia ventricular izquierda ya en la primera semana tras el clipaje y una hipertrofia en la capa media de los vasos de resistencia que alcanza un máximo a las 2-3 semanas. No obstante, no puede atribuirse el mantenimiento de las RPT sólo a los cambios estructurales ya que la eliminación del riñón isquémico o el desclipaje producen una rápida disminución de la PA con reducción de las RPT, a las 24 horas, y esto sucede antes de que tenga lugar la regresión de los cambios estructurales (Edmunds y cols., 1991).

El control del GC es complejo y depende de la contractilidad cardíaca, de las RPT y del llenado cardíaco, el cual depende del gradiente para el retorno venoso y por lo tanto está afectado por cambios en la presión media de llenado circulatorio (PMLLC) (Guyton y cols., 1973). Los cambios en la capacitancia vascular pueden jugar un papel muy importante. Capacitancia vascular puede ser descrita como capacidad vascular (o volumen contenido a una determinada presión de llenado) y la compliance (o distensibilidad) es la pendiente de una curva de presión-volumen a una capacidad determinada. La capacidad vascular está reducida en la hipertensión 2R-1C pero no la compliance vascular. La PMLLC está aumentada lo que podría ayudar a mantener el GC con un gran aumento de la postcarga (Edmunds y cols., 1989).

VI.10. RIÑÓN Y EQUILIBRIO HIDROSALINO.

El primer evento que sucede en la hipertensión 2R-1C es el aumento de la secreción de renina por el riñón isquémico. El aumento de la presión de perfusión inhibe la secreción de renina por el riñón no-clipado. Von Thun y cols.(1994) han demostrado que, dos semanas tras el clipaje, los niveles de mRNA de renina intrarrenales están multiplicados por tres en el riñón clipado y marcadamente suprimidos en el riñón no-clipado. A pesar de ésto los niveles intrarrenales de AII

en el riñón no-clipado son normales o están ligeramente aumentados y esto sucede aun cuando los niveles plasmáticos de AII son normales, por ello la AII en el riñón no-clipado es de producción intrarrenal mayoritariamente; de hecho, aunque los mRNA de renina están reducidos, no lo están los mRNA de angiotensinógeno (Zou y cols., 1996). La función del riñón no-clipado es esencial para el desarrollo y mantenimiento de este tipo de hipertensión y los efectos de la AII sobre el riñón no-clipado son fundamentales para explicar los cambios en la hemodinámica renal y el balance hidrosalino que caracterizan a la hipertensión 2R-1C.

La AII produce en el riñón no-clipado una alteración de la autorregulación renal: la eficacia del feedback tubuloglomerular está reducida, por ello el riñón no es capaz de mantener el TFG constante ante variaciones de la PA (la disminución del FSR produce una disminución del TFG) y esto se traduce en una retención de sal y agua (Braam y cols., 1995).

La AII en el riñón no-clipado produce un aumento de la RVR, una disminución del FSR, una disminución del TFG, un aumento de las resistencias pre y postglomerulares, una disminución de la constante de ultrafiltración (Kf) y un aumento de la reabsorción de sodio y agua por sus efectos a nivel del túbulo contorneado proximal y túbulo colector por la secreción de aldosterona. También aumenta la reabsorción de sodio y agua por las alteraciones hemodinámicas en las presiones hidrostáticas y oncóticas, creando un gradiente a favor de la reabsorción. Podría así contribuir a la producción y desarrollo de la hipertensión una inhabilidad del riñón para excretar sodio y volumen (Ploth, 1990).

A pesar de la tendencia a la retención hidrosalina, en este modelo de hipertensión no se suele detectar aumento del volumen extracelular (ni plasmático). No es preciso que exista un volumen aumentado para que se desarrolle hipertensión, podría existir un desequilibrio entre la capacidad del sistema circulatorio y el volumen que contiene (Guyton y cols., 1974).

VII. HIPERTENSIÓN POR INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO.

VII.1. ÓXIDO NÍTRICO. Furchgott y Zawadzki (1980) observaron que la relajación que provocaba la acetilcolina en arterias aisladas de conejo dependía de la presencia de un endotelio intacto. Esta relajación parecía ser debida a la acción de una sustancia sintetizada por el endotelio, a la que se denominó *factor relajante derivado del endotelio*, que actuaba aumentando los niveles de GMPc en las células musculares lisas. En 1987 Palmer y cols. la identificaron como óxido nítrico (Vanhoutte, 1989).

El NO es un radical libre inorgánico, de fórmula $\cdot\text{NO}=\text{O}$. El NO es un gas incoloro, fácilmente difundible a través de las membranas biológicas y muy inestable. Tiene una vida media muy corta, entre 5 y 8 segundos. Se inactiva rápidamente en contacto con moléculas como la hemoglobina dando lugar a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). La formación de NO en células de mamíferos está catalizada por una familia de isoenzimas denominadas sintasas de NO, de localización intracelular, que utilizan L-Arginina y O_2 molecular como sustratos. Las enzimas son dioxigenasas dependientes de NADPH que requieren tetrahidrobiopterina (BH_4), flavín-adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) como cofactores. Todas ligan calmodulina y contienen un grupo hemo. La síntesis de NO representa una reacción de oxidación de uno de los átomos de nitrógeno contenido en el grupo guanidino del aminoácido L-Arginina, dando como resultado NO y el coproducto L-Citrulina (Knowles y Moncada, 1994; Bachmann y Mundel, 1994).

Existen dos categorías básicas de las sintasas de NO. Una forma *constitutiva* que requiere calcio y calmodulina para producir NO, cuya actividad se ve incrementada por hormonas como acetilcolina o bradiquinina que al unirse a los receptores aumentan la concentración de calcio

intracelular. Una forma *inducible* que puede ser calcio-dependiente o calcio-independiente, cuya actividad puede ser inducida por lipopolisacáridos bacterianos y citoquinas (Sanders y cols, 1995).

Han sido clonadas tres isoenzimas de la familia de las sintasas de NO. Knowles y Moncada (1994) denominan y definen a los isoenzimas según el lugar donde fueron identificados originalmente: *sintasa de NO constitutiva neuronal (nNOS)*, presente en el SNC y periférico, es la responsable de la producción de NO por las neuronas no-adrenérgicas y no-colinérgicas; *sintasa de NO constitutiva endotelial (eNOS)*, se encuentra en las células endoteliales de arterias y venas y en el epitelio tubular renal; *sintasa de NO inducible (iNOS)*, encontrada en macrófagos, células endoteliales, células musculares lisas vasculares, etc.

VII.1.A. Mecanismos de liberación del NO.

El NO puede ser liberado por multitud de vías:

Basal: Es una liberación continua de NO por las células endoteliales no estimuladas. Éstas producen cantidades significativas de NO en condiciones de reposo, en ausencia de flujo sanguíneo y/o agonistas.

Estimulada.

a) *Por agonistas:* Estimulan la liberación del NO por encima del nivel basal. Puede ser de dos tipos, dependiente de receptor como la que producen la acetilcolina, el ATP o la bradiquinina e independientes de receptor, como la que consiguen los ionóforos del calcio, algunos policationes o los inhibidores de la Ca^{2+} -ATP-asa.

Los agonistas, dependientes e independientes de receptor, evocan una liberación de Ca^{2+} intracelular desde los almacenes intracelulares, mediado por un aumento transitorio de inositol-1,3,5-trifosfato (IP_3) y por un influjo más sostenido de Ca^{2+} a través de la membrana desde el espacio extracelular. El IP_3 es formado bajo la activación de una fosfolipasa C. El

aumento de Ca^{2+} intracelular conduce a la apertura de canales de K^+ activados por el Ca^{2+} , que resulta en una salida de K^+ fuera de la célula. Por un lado, la hiperpolarización resultante contrarresta los efectos despolarizantes del influjo de Ca^{2+} y, por otro, la salida de K^+ contribuye a sostener el influjo de Ca^{2+} . Además, los agonistas dependientes de receptor, como la bradiquinina, pueden aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} de los canales de K^+ , vía un mecanismo dependiente de una proteína G.

b) Por agentes físicos. Estos son el *shear stress* (o estrés por rozamiento del flujo), el estiramiento pulsátil de la pared del vaso y una baja presión parcial de O_2 . Puede representar el mecanismo fisiológico más importante de liberación de NO desde el endotelio vascular. La liberación producida por el *shear stress* parece ser el factor principal que regula el tono vascular y, de hecho, nutre de flujo sanguíneo a órganos activos mientras que la liberación mediada por agonistas puede ser considerada como una reserva para satisfacer los requerimientos locales transitorios de concentraciones más altas de NO, por ejemplo contrarrestando la formación de microtrombos. Es concebible que el estrés de rozamiento causado por el flujo sanguíneo sea percibido por estructuras localizadas en la parte externa de la membrana celular. Este "sensor" de *shear stress* no ha sido identificado, aunque podría estar acoplado a canales iónicos, al citoesqueleto o a almacenes de Ca^{2+} ligados a membrana. La hipoxia induce vasodilatación en una variedad de lechos vasculares. Así, las células endoteliales liberan autacoides vasoactivos, como NO y PGI_2 , en respuesta a la hipoxia. Aunque las enzimas NOS y cicloxigenasa requieren al O_2 como sustrato, su síntesis está aumentada porque el incremento crucial de Ca^{2+} intracelular tiene lugar dentro del rango bajo pero fisiológico de presión de O_2 (20-50 mmHg).

Por último, el NO de origen inducible se expresa únicamente después de una inducción transcripcional, en presencia de lipopolisacáridos bacterianos y/o citoquinas. Se localiza en células activadas por citoquinas, principalmente en macrófagos y células musculares lisas. La

sintasa inducible no parece estar sujeta a ningún mecanismo de control celular más que la disponibilidad de la L-Arginina y/o los cofactores necesarios (Busse y cols, 1993).

VII.1.B. Inhibidores de la sintasa de NO.

Análogos estructurales de la L-Arginina: muchos análogos de la L-arginina son inhibidores de la sintasa de NO, en particular aquéllos en los que son sustituidos asimétricamente los átomos de nitrógeno del grupo guanidino terminal. El mecanismo de inhibición de la actividad de la sintasa de NO implica la ocupación del lugar de unión del sustrato al enzima. La N^o-Nitro-L-Arginina (L-NNA), N^w-nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME) y N^o-Monometil-L-Arginina (L-NMMA) son los inhibidores más representativos de este grupo. Producen una inhibición competitiva, en mayor o menor grado, sobre ambos tipos de sintasa, constitutiva e inducible. El L-NAME es tan potente como el L-NNA para inhibir la NOS constitutiva, pero menos para la inducible. El L-NMMA no muestra una preferencia marcada por ninguna de las isoformas, siendo de los tres el de menor potencia.

Inhibidores específicos de la sintasa inducible de NO: La aminoguanidina ha sido descrita como un potente inhibidor específico de este enzima (Griffiths y cols, 1993). Algunos análogos estructurales de la L-Arginina parecen inhibir de manera más potente al enzima inducible que al constitutivo, aunque esta inhibición no es tan selectiva como la de la aminoguanidina.

Otros inhibidores: Otros inhibidores actúan sobre el NADPH y sobre la calmodulina causando también una inhibición competitiva. También se pueden usar los inhibidores de la BH₄ y otros agentes que interaccionan con el grupo hemo (el CO, el azul de metileno y el propio NO como sistema de inhibición feedback) (Knowles y Moncada, 1994).

VII.1.C. Mecanismo de acción del NO.

El NO generado dentro de la célula endotelial difunde hacia el músculo liso y activa a la

guanilato ciclasa soluble que eleva los niveles de GMPc. El mecanismo intracelular por el cual el aumento de GMPc produce vasorrelajación parece estar mediado por la fosforilación de una proteína quinasa que, a su vez, produce la defosforilación de la unidad reguladora de la cadena ligera de miosina, iniciando el proceso de relajación del músculo liso vascular (Dinerman y cols, 1993).

El NO se inactiva por oxidación a nitritos y nitratos, y la determinación de estos productos de la oxidación del NO en plasma y orina es el mejor método de cuantificar la producción de NO por los sistemas biológicos. También se puede cuantificar mediante la determinación de la excreción de GMPc urinario (Sanders y cols, 1995).

VII.1.D. Acciones del NO.

El NO es un agente vasodilatador que actúa como mediador local de los llamados vasodilatadores endotelio-dependientes (acetilcolina, bradiquinina, etc.) o como mediador de la acción vasodilatadora producida en procesos inflamatorios en respuesta a la histamina o bradiquinina. La liberación de NO en respuesta a ciertas hormonas como la vasopresina o las catecolaminas sería la responsable de la acción vasodilatadora de estas hormonas en territorios específicos, o actuaría como modulador de la acción vasoconstrictora generalizada de las mismas. Numerosos datos confirman que la liberación basal y estimulada de NO por el endotelio de la microvasculatura sirve como un importante regulador del tono de pequeñas arterias y arteriolas en los territorios esquelético, esplácnico, renal, cerebral y coronario, permitiendo una mejor distribución del flujo sanguíneo dentro de estos tejidos (Umans y Levi, 1995b).

El NO, como la prostaciclina, provoca un aumento del GMPc en las plaquetas. Esto refleja su acción antiagregante y la importancia que tiene en el mantenimiento de la permeabilidad vascular modulando la agregación plaquetaria. Algunos productos derivados de la coagulación y la agregación plaquetaria como el ADP, trombina, serotonina, factor activador de

plaquetas, producen liberación de NO, lo que explicaría por qué la presencia del endotelio protege de la formación de trombos.

A nivel renal, el NO ejerce importantes funciones. Juega un papel principal en la autorregulación renal modulando, probablemente, la contractilidad miogénica y evitando, así, una excesiva caída del FSR. Ésto sucede con presiones de perfusión renal altas: el diámetro está disminuido, la velocidad de flujo más elevada, el rozamiento sobre el endotelio será mayor y la liberación de NO aumentará (Romero y cols.,1989). La participación del NO sobre el mecanismo de presión-natriuresis fue estudiada por Salom y cols. (1992) en perros anestesiados. La infusión intrarrenal de L-NAME bloquea el incremento de natriuresis producido por una elevación de la presión de perfusión renal de 100 a 165 mmHg y dicho efecto inhibitor se previene por la infusión del precursor L-arginina. El NO ejerce una influencia tónica en el mantenimiento de la circulación medular renal (Mattson y cols, 1992).

VII.2. DÉFICIT CRÓNICO DE ÓXIDO NÍTRICO.

La administración, por vía oral, a largo plazo de análogos de la L-Arginina ha dado lugar a un nuevo modelo de hipertensión en el que se crea un estado de déficit selectivo de NO, como lo demuestra la reducida excreción urinaria de nitritos y nitratos y GMPc. Produce una marcada y sostenida elevación de la PA dependiente de dosis y tiempo (Ribeiro y cols.,1992; Pollock y cols.,1993;Takase y cols,1996;Qiu y cols.,1998).La alteración en la PA provocada por la inhibición de la síntesis de NO no es rápidamente corregida por mecanismos homeostáticos.Ésto es debido a que el NO interviene de un modo amplio en los sistemas de regulación de la PA. Así, inhibe la actividad nerviosa simpática postganglionar, inhibe la actividad preganglionar en la glándula adrenal, modula la sensibilidad del barorreceptor carotídeo, aumenta la capacitancia vascular disminuyendo la PMLLC, altera la secreción de renina (Umans y Levi, 1995a).

VII.2.A. Efectos Cardiovasculares.

El NO se secreta basalmente y regula el tono vascular y la PA. La administración de análogos de la L-Arginina provoca una hipertensión arterial severa que se acompaña de una disminución del GC y un incremento de las RPT (Widdop y cols., 1992; Huang y cols.,1995; Wang y cols.,1995).

Todos los estudios sobre hemodinámica cardiocirculatoria en los que se inhibe la síntesis del NO detectan un aumento de la PA por un gran incremento de las RPT debido a la vasoconstricción de las arterias periféricas (Widdop y cols.,1992; Huang y cols.,1995; Takahashi y cols.,1995; Wang y cols.,1995).

La administración de inhibidores de la NOS a dosis bajas, subpresoras, potencia las respuestas presoras a la infusión de AII, norepinefrina o arginina vasopresina (Conrad y Whittmore, 1992). Estas observaciones indican que la liberación local del NO sucede de forma basal y continua modulando los efectos de los vasoconstrictores locales y circulantes y ayudando en último término a regular la PA y el flujo sanguíneo de los órganos. Si el NO ejerce un efecto tónico vasorrelajante sobre la microcirculación, su inhibición persistente conduce al predominio de agentes vasoconstrictores, resultando en una hipertensión similar a la observada tras la infusión crónica de AII, norepinefrina o tromboxano. (Ribeiro y cols, 1992).

Las alteraciones de la reactividad vascular en la hipertensión por déficit de NO han sido estudiadas en preparaciones in vitro. El pretratamiento con L-NAME de anillos de aorta elimina la respuesta de relajación a acetilcolina, un vasorrelajante que actúa a través del NO (Ortiz y cols.,1996b). Moore y cols. (1990) hallaron que el L-NAME inhibe los efectos vasodilatadores de la acetilcolina en lechos vasculares mesentéricos de rata perfundidos y precontractados. El lecho vascular mesentérico aislado y perfundido muestra una mayor reactividad vascular a agentes vasopresores, como la metoxamina, en ratas hipertensas por déficit de NO (Ruiz y cols,1998).

Todo esto confirma el estado de predominio del tono vasoconstrictor sobre el vasodilatador en el déficit crónico de NO.

Gardiner y cols.(1990) estudiaron las respuestas hemodinámicas que provoca un bolo de L-NAME a ratas conscientes instrumentadas con un medidor doppler de flujo y observaron que producía efectos presores y una disminución del flujo sanguíneo dosis-dependiente en los lechos vasculares renal, mesentérico y patas traseras. Además, la administración aguda oral o intravenosa de inhibidores de la sintasa del NO provoca un aumento de las resistencias vasculares de los lechos renales, espláncnicos y mesentéricos con una marcada disminución del flujo sanguíneo en estos territorios (Ribeiro y cols,1992). El incremento en las RPT y las disminuciones del flujo en los lechos vasculares de diferentes órganos (riñón, hígado, estómago, intestino, testículo) no son debidas a una activación del SNS ya que se siguen produciendo en presencia del bloqueo ganglionar con hexametonio. Otros investigadores sí han encontrado que la estimulación del SNS tiene un papel muy importante en la hipertensión por déficit crónico de NO (Cunha y cols.,1993; Sander y cols.,1995).

La inhibición de la sintasa del NO disminuye significativamente el contenido de GMPc de las paredes arteriales. De hecho, la L-NMMA y la hemoglobina reducida, inhibidores de la síntesis del NO, inhiben la formación de GMPc estimulado por metacolina e histamina, ambos vasodilatadores que actúan a través del NO (Conrad y Whittemore, 1992). Esta falta de capacidad del músculo liso vascular para generar GMPc puede ser también un mecanismo para producir hipertensión. Así, la respuesta a nitroprusiato sódico, donador exógeno de NO, cuya acción vasodilatadora es independiente del endotelio, se ve aumentada en anillos de vasos mesentéricos y de aorta de rata (Henrion y cols.,1996) y en el territorio vascular renal (Vargas y cols., 1996). Esto podría deberse a un estado de hipoestimulación previa de la guanilato ciclasa provocado por la inhibición continua del NO.

El GC se ve afectado en las dos variables que lo determinan, el VS y la FC. Widdop y cols. (1992) utilizando ratas conscientes, crónicamente instrumentadas con un medidor de flujo electromagnético torácico, observan que tras la administración de L-NAME se produce una reducción de la conductancia periférica total, del GC, del VS y del índice máximo de aumento de flujo aórtico. La disminución del índice cardíaco no depende de alteraciones en el control neural del corazón, como lo demuestra que se sigue produciendo con el bloqueo autonómico cardíaco con atropina y atenolol, sino del incremento de la postcarga por la fuerte vasoconstricción que se produce. Tampoco es debida a mecanismos neurogénicos periféricos ya que Huang y cols. (1994) obtuvieron reducciones del 50 % del GC tanto en animales con el sistema nervioso autónomo bloqueado con hexametonio como en animales controles. Gardiner y cols.(1990) aluden a un posible efecto inotrópico negativo causado por el L-NAME, resultado de la vasoconstricción de la vasculatura coronaria y/o a un efecto miocárdico directo, ya que la reducción del VS es muy marcada. Sin embargo, Takahashi y cols., (1995) no detectan un incremento de las resistencias vasculares de los territorios cerebral o cardíaco, aunque sí de otros órganos.

El retorno venoso, otro factor que puede afectar al GC, también está alterado en la hipertensión L-NAME. Wang y cols. (1995) encuentran un incremento dosis-dependiente de la PAM, RPT, y resistencias al retorno venoso junto a una disminución del GC pero sin afectar a la PMLLC. Por el contrario Glick y cols.(1993) sí encuentran un aumento dosis-dependiente de la PMLLC que refleja la disminución de la capacitancia venosa total y el incremento del tono venoso total basal. En ambas experiencias todas las modificaciones producidas por el L-NAME se revierten con L-arginina y se producen tanto en presencia como en ausencia de bloqueo ganglionar, demostrando que no son debidas al estímulo del SNS.

La administración de L-NAME de forma aguda produce una bradicardia muy intensa y sostenida. Esta disminución de la FC es de tipo reflejo ya que se registra un incremento de la

actividad vagal eferente y la atropina es capaz de revertirla totalmente (Widdop y cols, 1992). La hipertensión L-NAME crónica también se acompaña de bradicardia y aquí no podemos explicarla por el efecto compensador de los barorreceptores ya que estos se habrían acomodado ante un incremento crónico de la presión. No obstante, sí puede haberse producido una alteración en la sensibilidad del barorreflejo ante la ausencia de NO por el papel que podría tener en su regulación la producción local de NO a nivel del seno carotídeo, o la influencia que en el control del barorreflejo, por los centros cerebrales, pudiera ejercer el NO neuronal (Manning y cols, 1993).

VII.2.B. Riñón y equilibrio hidrosalino.

La administración de L-NAME provoca un incremento en las resistencias vasculares renales con una disminución los flujos sanguíneos renal y papilar (Ortiz y cols, 1996a) y en la TFG y la aparición de proteinuria (Qiu y cols.,1998).

Uno de los factores que podría contribuir al desarrollo de este tipo de hipertensión es un aumento de volumen sanguíneo, ya que el NO endógeno ejerce un efecto tubular directo inhibiendo la reabsorción de sodio y dosis bajas de inhibidores de la sintasa del NO son antinatriuréticas (Lahera y cols, 1991). Sin embargo, Manning y cols.(1993), Hu y cols.(1994) y Navarro y cols.(1994), no han encontrado cambios en el balance de sodio y agua durante los días de infusión de L-NAME. Estos resultados indican que el incremento en la PA por inhibición crónica de la síntesis de NO es capaz de contrarrestar cualquier retención de sodio a nivel renal volviendo a colocar en un nuevo punto de equilibrio la relación presión-natriuresis, concluyendo que la hipertensión por déficit crónico de NO no es volumen-dependiente. Pollock y cols. (1993) han observado, en ratas tratadas crónicamente con L-NAME, un incremento en la excreción de agua independientemente del nivel de PA, atribuyendo un posible papel del NO en la excreción de agua a través de sus efectos sobre la secreción de hormona antidiurética o su efecto en túbulo

colector. Qiu y cols. (1998) han obtenido una contracción del volumen plasmático, resultado de una respuesta natriurética a la administración de L-NAME.

La hipertensión por déficit crónico de NO se asocia a alteraciones histológicas renales típicas de una hipertensión maligna: engrosamiento de las paredes arteriolares, colapso glomerular focal y necrosis fibrinoide (Ribeiro y cols, 1992); albuminuria, glomerulosclerosis y expansión intersticial renal (Yamada y cols.,1996)

VII.2.C. Sistema renina-angiotensina.

El aumento de la PA en respuesta a la inhibición crónica de la NOS es complejo, y no es debido simplemente al déficit de NO, ya que existen evidencias de que la hipertensión causada por el uso crónico de L-NAME es dependiente de la AII (Melaragno y cols., 1996; Qiu y cols., 1998). Efectivamente, el empleo de un antagonista específico de la AII o un IECA atenúa el desarrollo de la hipertensión arterial y previene las alteraciones morfológicas y funcionales en ratas tratadas con L-NAME (Ribeiro y cols,1992; Pollock y cols, 1993). Así, el losartán previno totalmente el desarrollo de la hipertensión, la disminución en el GC y la hipertrofia cardíaca asociada a la administración crónica de L-NAME a ratas durante 25 días (Jover y cols.,1993). No obstante, la dependencia de la AII de este tipo de hipertensión no está causada por una ARP elevada. Los resultados de ARP obtenidos durante la inhibición crónica del NO son contradictorios. Mientras que Ribeiro y cols. (1992) y Hu y cols. (1994) la encuentran elevada, Pollock y cols. (1993) y Qiu y cols. (1998) obtuvieron concentraciones inferiores que en animales controles. Manning y cols. (1993) y Jover y cols. (1993) no han hallado alteraciones en la ARP. Estas discrepancias podrían deberse a que, aunque el NO produce una disminución de los niveles de renina por un aumento en los niveles de GMPc de las células yuxtglomerulares y, por lo tanto, la inhibición del NO produciría un incremento de la ARP, el aumento de la PA provocaría el efecto opuesto. Podríamos suponer, por lo tanto, que la ARP sería el resultado de un equilibrio

o desbalance entre estos dos efectos opuestos. Navarro y cols. (1994) encuentran que la inhibición crónica de NO usando dosis altas de L-NAME provoca una disminución de la ARP. Para estos autores, el SRA circulante no tiene un papel demasiado importante en el mantenimiento de este tipo de hipertensión, pero ya que se puede atenuar con IECA o losartán, podría deducirse que es el SRA tisular el que realmente participa en la hipertensión L-NAME. Otra posible explicación es que el bloqueo crónico de la sintasa del NO puede producir una hipersensibilidad a la AII debido a la ausencia de la normal modulación del NO derivado del endotelio (Qiu y cols., 1998).

VII.2.D. Sistema nervioso simpático.

Durante la inhibición crónica de la síntesis de NO existe una activación del SNS que puede ser desencadenada por la inhibición de la síntesis de NO cerebral ya que el L-NAME administrado oralmente atraviesa la barrera hematoencefálica. (Zanchi y cols., 1995). Navarro y cols. (1994) encontraron concentraciones plasmáticas de epinefrina y norepinefrina elevadas con dosis altas de L-NAME. Además, la reducción de la PA inducida por un antagonista de los receptores AT1 de AII se ve potenciada con la administración de un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos. Estos resultados sugieren una participación tanto del SRA como del SNS en la hipertensión inducida por L-NAME (Qiu y cols., 1994).

VII.2.E. Reversibilidad.

Aunque la administración de L-Arginina, sustrato de la sintasa de NO e inhibidor competitivo del L-NAME, revierte de forma aguda el aumento de la PA debido a la administración aguda de los inhibidores de la sintasa de NO, tiene poco o ningún efecto antihipertensivo tras la administración crónica de L-NAME. Por lo tanto, en hipertensión por la administración crónica de inhibidores de la NOS, además del déficit de NO es posible que sea debida en parte a la amplificación y/o activación de otros sistemas vasoconstrictores. La inhibición de la AII revierte la hipertensión establecida y reduce la hipertensión persistente tras

la interrupción del L-NAME crónico (Qiu y cols., 1998).

Hu y cols. (1994) tras un periodo de infusión de L-NAME de 9 días, consiguieron que la infusión de L-Arginina retornara la PA a sus valores normales en un día. Otros investigadores no han encontrado el mismo efecto. Estas discrepancias pueden deberse al tiempo de duración de la hipertensión, que haya provocado alteraciones estructurales vasculares y renales.

Takase y cols.(1996) han encontrado una alteración en la relajación dependiente del endotelio a acetilcolina en arterias renales y mesentéricas de ratas tratadas crónicamente con L-NAME y que esta alteración se anula cuando se las trata con verapamil y trandolapril. Además, verapamil y trandolapril previnieron el aumento de presión del L-NAME en ratas cuando se administraron juntos en el agua de bebida durante 6 semanas (Kung y cols.,1995).

VIII. PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR (PNA).

El PNA es un péptido que en humanos se sintetiza como una secuencia de 151 aa. denominada preproPNA. Esta preprohormona es similar a la de otras especies como rata, perro y conejo. La separación de un fragmento peptídico "señal" da lugar al proPNA, de 126 residuos, principal forma de almacenaje de la hormona, que presenta cierta actividad PNA. El péptido bioactivo procede de la porción carboxiterminal por la actuación dentro del miocito, probablemente, de una atrioactivasa que rompe la unión Arg98-Ser99. El fragmento resultante es la principal forma circulante de la hormona, el PNA Ser99-Tyr126, o más comúnmente conocido como PNA(1-28). El PNA humano es idéntico al de la rata excepto en la posición 12, donde una isoleucina sustituye a una metionina (Brenner y cols.,1990). Dos condiciones son esenciales para que el péptido sea biológicamente activo: un anillo central de 17 aa. formado por un puente disulfuro entre los residuos de Cys7-Cys23, y que los aa. carboxiterminales sean Phe-Arg-Tyr (Goetz, 1988).

El PNA se sintetiza fundamentalmente en los cardiomiocitos auriculares donde se encuentra almacenado en unos gránulos electrón-densos localizados en el polo nuclear, cerca del aparato de golgi y es secretado a la sangre a través del seno coronario. Estudios de m-RNA -PNA han demostrado que también se sintetiza en otros órganos: miocitos ventriculares del feto, miocitos ventriculares en situaciones de hipertrofia ventricular o insuficiencia cardíaca congestiva, arco aórtico, pulmón, hipófisis anterior, hipotálamo, adrenales, riñón y cerebro (nucleo paraventricular, que sintetiza vasopresina e influye en la pituitaria anterior y en la función del sistema nervioso autónomo, y en la región anteroventral del tercer ventrículo, importante en la regulación de la PA) (Brenner y cols., 1990).

Los genes que codifican el preproPNA en humanos se localizan en el brazo corto del cromosoma 1 y están constituidos por dos intrones intercalados entre tres exones. Los glucocorticoides podrían regular la expresión de los genes del PNA ya que se ha encontrado un posible receptor para glucocorticoides en el segundo intrón (Cogan, 1990).

VIII.1. SECRECIÓN DEL PNA.

El principal estímulo para la secreción del PNA es el aumento de tensión de la pared auricular provocado por el incremento de la presión auricular, de tal forma que si aumenta la presión auricular sin estiramiento de la pared (por ejemplo, provocando un taponamiento cardíaco) los niveles de PNA no se modifican. Lang y cols. (1985) encontraron una estrecha correlación entre la presión auricular derecha y los niveles plasmáticos de PNA, de forma que el incremento en 1 mmHg de presión atrial provoca un aumento del 30-40 % de los niveles basales de PNA. Agentes vasoconstrictores como fenilefrina, AII y vasopresina estimulan su secreción sólo si elevan la PA, y se cree que el mecanismo implicado es el incremento de las presiones auriculares derecha e izquierda (Inoue y cols.,1988; Christensen y cols.,1989).Una expansión aguda de volumen es un fuerte estímulo para la secreción del PNA, ya que aumenta el volumen sanguíneo y la presión venosa central (Pettersson y cols., 1988), y este estímulo se ve atenuado con la hipofisectomía, por lo que la hipófisis sería necesaria para una función endocrina cardíaca normal (Dietz y Nazian, 1988).

Los mecanismos celulares íntimos que regulan la secreción de PNA desde los miocitos atriales no se conoce con exactitud. Parece que son el sistema del inositol trifosfato y el calcio los principales moduladores intracelulares de la secreción. La secuencia de acontecimientos podría ser ésta: la estimulación de un receptor o el estiramiento del miocito auricular provocaría la síntesis de inositol trifosfato, que movilizaría el calcio y activaría la protein-c- kinasa (Goetz, 1988).

La endotelina estimula la secreción basal de PNA y la inducida por estiramiento de la pared auricular (Mäntymaa y cols.,1990). Debido a que la endotelina produce vasoconstricción, antidiuresis, antinatriuresis y aumenta la secreción de PNA sin modificar la presión auricular, se pretende ver en ella un importante antagonista biológico del PNA (García y cols.,1990). Al NO

derivado del endotelio se le atribuye una inhibición tónica de la secreción de PNA (Sánchez-Ferrer y cols.,1990).

VIII.2. ACLARAMIENTO DEL PNA CIRCULANTE.

La vida media del PNA en el torrente circulatorio es de 1 a 4 minutos. El borde en cepillo de los túbulos proximales renales, el pulmón, el endotelio vascular e hígado poseen capacidad de aclarar de la circulación el PNA. La endopeptidasa neutra EC 24.11 (también llamada metaloendopeptidasa o encefalinasa) es la enzima que degrada el PNA rompiendo el anillo central en la unión Cys7-Phe8. In vivo, el uso de fosforamidon o tiorphan, dos potentes inhibidores de la endopeptidasa EC 24.11, aumentan los niveles de PNA plasmático y concomitantemente la excreción urinaria de sodio, excreción fraccional de sodio y el GMPc urinario (Hollister y cols.,1989;Lafferty y cols.,1989; Webb y cols.,1989). También es eliminado de la circulación por su unión a los receptores denominados de aclaramiento o receptores C.

VIII.3. RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN CELULARES DEL PNA.

Utilizando técnicas de autorradiografía se han descubierto receptores de PNA en muchos tejidos del organismo: zona glomerulosa de la corteza adrenal, conductos colectores de la médula interna, células endoteliales y mesangiales del glomérulo renal, células endoteliales y musculo liso vascular, SNC, epitelio pigmentado y procesos ciliares de los ojos, hepatocitos, vesícula biliar, músculo liso colónico, parénquima pulmonar (Brenner y cols.,1990).

Existen, por lo menos, tres tipos de receptores de PNA: receptor tipo A (GC-A), receptor tipo B (GC-B) y receptor tipo C. El *receptor tipo C* o *receptor de aclaramiento* es una proteína asociada a membrana que no está acoplada a la guanilatociclasa. Presenta alta afinidad por el PNA, fragmentos de PNA y PNA con el anillo roto. Estos datos, asociados a la gran abundancia en las células endoteliales vasculares, sugieren que el receptor sirve para el aclaramiento del PNA (Maack y cols.,1987).

El *receptor tipo A o GC-A* presenta selectividad para el PNA (1-28). Cuando interactúa con él el PNA estimula una *guanilatociclasa particular* asociada a membrana produciéndose GMPc. Por este motivo sus acciones renales y vasculares van siempre acompañadas de un incremento de los niveles de GMPc urinarios e intersticiales. En el músculo liso vascular el aumento de los niveles de *GMPc* activa la *proteinkinasa dependiente del GMPc* y la fosforilación de un gran número de proteínas intracelulares que parecen mediar las acciones del PNA. Además, el GMPc desfosforilaría la cadena ligera de la miosina induciendo la relajación de la célula lisa muscular. Recientemente se ha demostrado que el receptor de PNA, la guanilatociclasa y la proteinkinasa son la misma proteína transmembrana que presenta un dominio extracelular, el receptor, y dos dominios intracelulares, las enzimas. Si el efecto del PNA y el GMPc es en última instancia sobre el turnover del *fosfatidil inositol* no se conoce todavía. Sí se ha observado que el PNA interfiere con el *calcio* y su regulación podría situarse a nivel de la liberación desde compartimentos intracelulares, recaptación de calcio hacia esos lugares de almacenamiento o en el paso del calcio a través de la membrana citoplasmática o membranas de las organelas intracelulares (Brenner y cols.,1990).

La acción del PNA sobre la adenilatociclasa no está todavía aclarada. Mientras inhibe la producción basal y estimulada de AMPc en unos tejidos, en otros no.

El *receptor tipo B o GC-B*, estructuralmente similar al tipo A, podría ser más selectivo para el péptido natriurético cerebral o PNB y para el PNC. Su activación también produce un aumento del GMPc.

VIII.4. OTROS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS.

PNB. El PNB o *péptido natriurético cerebral* se denomina así porque se aisló por primera vez del cerebro del cerdo, actualmente se sabe que es más abundante en aurícula que en SNC. Es una secuencia de 32 aa. que tiene gran similitud con el PNA ya que presenta un anillo de 17 aa.

formado por un puente disulfuro. Es más selectivo para el receptor tipo B. Las acciones biológicas son similares a las del PNA. En el riñón produce diuresis y natriuresis, en la vasculatura, hipotensión y disminución del volumen del fluido intravascular y, sobre las hormonas, disminución de la renina y aldosterona. Todo ello se acompaña de un aumento del GMPc (McDowell y cols.,1995).

PNC. Ha sido el último descrito de la familia de los péptidos natriuréticos. Se aisló del cerebro del cerdo en una secuencia de 22 aa. estructuralmente relacionados con el PNA y PNB ya que sigue poseyendo el anillo de 17 aa. cerrado con un puente disulfuro. Aunque no se detectan concentraciones de PNC en el torrente circulatorio está presente en endotelio vascular, riñón, intestino, líquido cerebroespinal (donde puede tener una función autocrina regional), hipotálamo, tálamo y cerebelo, donde puede funcionar como neuromodulador.

Sólo es capaz de estimular los receptores tipo B (GC-B), no los tipo A y produce un aumento del GMPc. Por su amplia localización en tejidos cerebrales podría tener sobre todo efectos a nivel de SNC, aunque la infusión intravenosa del PNC evoca acciones biológicas semejantes a la del PNA y PNB pero de menor intensidad. Así produce un incremento en la excreción de sodio, agua y electrolitos, disminuye la presión de llenado cardíaca, el GC y la PA, produce venodilatación y reduce el retorno venoso (Lewicki y Protter, 1995).

VIII.5. ACCIONES DEL PNA SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.

Infusiones agudas y crónicas de PNA reducen la PA en individuos y animales hipertensos y normotensos. Los mecanismos responsables incluyen la disminución del GC, reducción del volumen intravascular, descenso de las RPT y antagonismo de las acciones vasoconstrictoras del SRA. La importancia relativa de cada uno de estos mecanismos varía con el estado basal del

sujeto experimental, en la medida que otros factores que regulan la presión sanguínea, como el sistema nervioso autónomo, estado de volumen y niveles de AII y noradrenalina circulantes también ejercen importantes influencias en la respuesta cardiovascular global del PNA (Brenner y cols., 1990).

VIII.5.A. Efectos del PNA sobre el gasto cardíaco.

El PNA reduce la PA fundamentalmente a través de una disminución del GC (Edwards y cols., 1986; Chien y cols.,1987; Klee y Goldman, 1989; Salom y cols., 1989; Woods y cols.,1989; Shen y cols.,1990). Un primer efecto implicado es la depresión de la función miocárdica, efecto inotrópico negativo. Si esto sucediera las presiones auriculares aumentarían. Sin embargo, Natsume y cols.(1986) observaron que tras la administración de PNA las presiones auriculares derecha e izquierda y la presión venosa central disminuyen y que un bolo de PNA a dosis natriurética máxima no altera la habilidad del corazón para incrementar el volumen sistólico en respuesta a infusiones rápidas de sangre. Otro factor involucrado ha sido la inhibición de la actividad del SNS, que contribuiría a la hipotensión, la disminución de la FC, la disminución de la contractilidad miocárdica y al efecto natriurético que acompaña a la administración del péptido (Schultz y cols., 1988). Holtz y cols.(1987) encontraron que la hipotensión provocada por infusiones de PNA en animales conscientes con el sistema nervioso autónomo intacto no produce igual incremento en la FC que un descenso de presión de la misma magnitud provocado por vasodilatadores como nitroprusiato o hidralazina que activan el reflejo barorreceptor. Tampoco encontraron aumento del índice de secreción de noradrenalina durante la hipotensión inducida por el PNA, sugiriendo una acción inhibitoria simpatoadrenal del péptido. Este efecto simpatoinhibitorio desaparece con la vagotomía bilateral, indicando que está mediado por la activación de aferentes vagales y más concretamente por las fibras amielínicas-c-vagales (Schultz y cols., 1988). Además la vagotomía bilateral disminuye el efecto hipotensor del PNA

cuando se compara con animales con los vagos intactos (Brenner y cols.,1990).

Por otro lado el incremento de la actividad simpática esperado no sucede si se secciona el vago y se preservan los barorreceptores arteriales. Esto sugiere que, además de una sensibilización de los receptores cardiopulmonares, el PNA también altera el control del reflejo barorreceptor arterial (Takeshita, 1990). Según Hirooka y cols. (1988) la actividad nerviosa de los nervios aórticos no cambia, a pesar de la hipotensión inducida por el PNA, debido a que la dilatación que produce en la aorta permite que el estiramiento de los barorreceptores aórticos no disminuya y la actividad nerviosa permanezca inalterada.

No obstante, el mayor número de evidencias indican que son las acciones del PNA sobre la circulación periférica las responsables de la reducción del GC mediante una disminución del retorno venoso. Para ello se implican tres posibles factores que, disminuyendo el retorno venoso, reducen la precarga cardíaca: el incremento de la capacitancia venosa, la disminución del volumen sanguíneo y el aumento de las resistencias al retorno venoso (Trippodo, 1987).

VIII.5.B. Incremento de la capacitancia venosa.

Dos evidencias experimentales apuntaron inicialmente a la capacidad venodilatadora del PNA, y el consiguiente incremento de la capacitancia venosa, como la responsable de la disminución de la precarga cardíaca: su capacidad para dilatar segmentos de vasos precontraídos con fuertes vasoconstrictores y el poder revertir, en el animal consciente, la venoconstricción inducida por la AII (Lee y cols.,1989). Sin embargo cuando se midió el efecto de una infusión constante de PNA sobre la relación PMLLC-volumen sanguíneo, relación que refleja el tono venoso global, se demostró que no la modificaba, indicando que el PNA no dilata los vasos de capacitancia y que éste no es un mecanismo importante por el cual disminuye el retorno venoso y la precarga cardíaca (Trippodo, 1987).

La infusión del péptido produce una elevación del hematocrito de aproximadamente un

10 %, correspondiendo a una pérdida estimada del volumen total de un 15 % (Valentin y cols.,1988). El primer mecanismo implicado como responsable de este fenómeno fue la potencia diurética del PNA. Utilizando eritrocitos marcados radioactivamente para medir volumen plasmático Trippodo y Barbee (1987) observaron, en ratas anestesiadas, que una infusión de PNA produjo una reducción de 3.7 ml/kg del volumen plasmático asociado con un aumento del volumen urinario de 9.9 ml/kg. Trabajos posteriores realizados en ratas binefrectomizadas demostraron que el péptido seguía disminuyendo el volumen plasmático e incrementando el hematocrito y la concentración de proteínas plasmáticas, por lo que, además, existe un mecanismo extrarrenal de pérdida de fluido de los compartimentos vasculares (Valentin y cols.,1988). Trippodo y Barbee (1987) sugirieron que habría una filtración de fluidos desde el compartimento vascular hacia los tejidos por un incremento en la presión hidrostática capilar subsecuente a la venoconstricción que provocaba el PNA y que era la responsable del aumento de resistencias al retorno venoso. Por otro lado Laragh (1987) propuso que la reducción del retorno venoso era el resultado de un movimiento de fluidos desde el compartimento vascular hacia el espacio intersticial a causa de una alteración de la permeabilidad capilar a las proteínas plasmáticas. Meyer y Huxley (1990) encontraron, en preparaciones de capilares mesentéricos, que el PNA aumentaba la conductancia hidráulica, sobre todo, de las vénulas capilares y Eizo y cols.(1989) hallaron que el PNA aumentaba el coeficiente de filtración corporal total. Por el contrario, Eliades y cols.(1990) observaron en sus experiencias que el PNA ni producía venoconstricción ni influía directamente en la permeabilidad de la membrana microvascular a las proteínas plasmáticas.

VIII.5.C. Efectos del PNA sobre las RPT.

El PNA relaja in vitro segmentos de arterias precontraídas con fuertes vasoconstrictores como AII, norepinefrina o vasopresina. Muchos han implicado este efecto vasorrelajante como el

mecanismo hipotensor del péptido (Volpe y cols., 1986). Sin embargo Lappe y cols., (1987) observaron que una infusión de PNA en ratas reducía el GC pero aumentaba las resistencias de los lechos renal y mesentérico y las RPT, probablemente como mecanismo compensatorio para mantener la PA dentro de valores normales. Shen y cols. (1990) han comprobado que las acciones vasculares del PNA son diferentes según la especie estudiada. Así, en perros conscientes produce una vasoconstricción directa, ya que la denervación o el bloqueo del sistema nervioso autónomo no modifica las RPT; en monos el PNA produce fundamentalmente una vasoconstricción refleja abolida por el bloqueo ganglionar y en ratas conscientes la vasoconstricción es directa y refleja.

Para algunos autores (Trippodo, 1987; Chien y cols.,1987) la disminución del GC provocada por el PNA es debida a una reducción del retorno venoso provocado por un aumento de las resistencias al retorno venoso debido a la fuerte venoconstricción periférica que produce el péptido.

VIII.6. EFECTOS RENALES DEL PNA.

En el riñón existe gran abundancia de receptores del PNA: glomérulo, células mesangiales, túbulos colectores, porción gruesa del asa ascendente de Henle, vasa recta medulares; y ninguno en túbulo proximal. La infusión del PNA produce una marcada diuresis y natriuresis acompañadas de un aumento de la excreción urinaria de fosfato, calcio, magnesio, cloro y GMPc (López-Novoa, 1993).

Muchos estudios sugieren que una parte importante de los efectos del PNA están mediados por un aumento de la TFG y la fracción de filtración. En efecto, el PNA dilata la arteriola aferente y contrae la eferente creando una presión hidrostática aumentada dentro de los capilares glomerulares y una fuerza neta de ultrafiltración. Además el PNA relaja las células

mesangiales glomerulares aumentando la superficie efectiva de ultrafiltración y el Kf (Brenner y cols., 1990).

Sobre el FSR existen datos contradictorios. Hay quienes encuentran un aumento del FSR y una disminución de las resistencias vasculares renales por el efecto vasodilatador del PNA (Caramelo y cols., 1986). Otros, por el contrario, han observado una disminución del mismo debido a la reducción de la PA o al incremento de las resistencias vasculares renales (Gellai y cols., 1986). Además, el efecto del PNA sobre el FSR podría depender del estado de expansión de volumen extracelular del animal o de la forma de administración del péptido (bolo o infusión) (Lappe y cols., 1986).

Granger y cols. (1986) observaron que el PNA a dosis bajas puede aumentar la natriuresis sin modificar la TFG, por lo que el PNA ejerce sus efectos natriuréticos mediante una reducción de la reabsorción tubular. El PNA no puede modificar directamente la reabsorción de sodio en túbulo proximal porque no existen receptores de PNA a ese nivel. No obstante, Jonhs y Rutkowski (1989) encontraron que el PNA modificaba la fracción excrecional de litio en ratas hipertensas DOCA-sal, por lo que inhibe la reabsorción a nivel de túbulo contorneado proximal. Este efecto puede ser debido a una inhibición de la renina por parte del PNA, que disminuiría la concentración de AII en túbulo contorneado proximal e impediría la reabsorción de sodio que promueve la AII a ese nivel (Brenner y cols.,1990).

A nivel de túbulos colectores medulares, donde sí existen receptores, el PNA inhibe la reabsorción tubular de sodio y la reabsorción de agua mediada por la vasopresina (Willenbrock y cols.,1989).

El aumento en la filtración glomerular y el aporte distal de sodio más solutos, junto con un aumento del flujo sanguíneo de los vasa recta (flujo sanguíneo medular), produce un lavado medular con la desaparición del gradiente medular de solutos, por lo que disminuye la

reabsorción pasiva en el asa ascendente de Henle y, por lo tanto, se aumenta el aporte al túbulo colector. Éste sobrepasa su capacidad de reabsorción, por lo que disminuye la reabsorción neta. Este efecto contribuye a la respuesta natriurética del PNA (Brenner y cols., 1990).

VIII.7. ANTAGONISMO PNA-SRA.

El antagonismo del SRA parece ser uno de los papeles principales del PNA dentro de la regulación de la homeostasis hidrosalina. El PNA inhibe la secreción de renina y disminuye los niveles de ARP. Ésto podría ser un efecto directo del péptido sobre las células yuxtglomerulares en un proceso mediado por el GMPc (Kurtz y cols., 1986), pero ni está perfectamente aclarado ni es preciso, ya que los efectos hemodinámicos renales del PNA por sí mismo inhiben la secreción de renina. El aumento de la carga distal de cloruro sódico, debido tanto al aumento del filtrado glomerular como a la rotura del balance túbulo-glomerular, permite una mayor llegada de cloruro sódico a las células de la mácula densa, estímulo inhibitorio para la secreción de renina (Opgenorth y cols., 1986). El efecto vasodilatador del PNA sobre la arteriola aferente aumentaría la presión hidrostática en las células de la zona del aparato yuxtglomerular, muy sensible a la distensión (Sosa y cols., 1985).

El PNA inhibe la secreción de aldosterona, tanto basal como estimulada, por parte de la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal, pero este efecto es especialmente potente cuando la estimulación se realiza con AII.

El PNA antagoniza casi todos los efectos fisiológicos de la AII. Así inhibe su efecto presor in vivo y su efecto constrictor in vitro (Casto y cols., 1987). El PNA antagoniza el aumento de la reabsorción tubular proximal inducido por la AII (Johns y Rutkowski, 1989). La administración central de PNA inhibe la sed y la liberación de ADH y ACTH inducidas por la AII (Casto y cols., 1987).

PLANTEAMIENTO

Y

OBJETIVOS

El antagonismo del sistema renina-angiotensina (SRA) parece ser uno de los mecanismos principales por los que el péptido natriurético auricular (PNA) interviene en la regulación de la presión arterial (PA) y en la homeostasis hidrosalina. Este trabajo de investigación trata de profundizar en el análisis de la interacción cardiovascular, mediante el estudio de la hemodinámica sistémica, entre PNA y SRA.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han sugerido que no existe antagonismo funcional entre el SRA y el PNA, a nivel de la hemodinámica sistémica. En estos trabajos se utilizó un inhibidor del enzima de conversión (IECA) para inhibir el SRA. Como quiera que los IECA inhiben la degradación de las cininas además de inhibir la formación de AII, efecto por el que también pueden modificar la PA, nosotros hemos utilizado bloqueantes de los receptores de AII para evitar estas acciones y realizar un bloqueo puro del SRA. Estos han sido la saralasinina y el losartán. La saralasinina es un antagonista peptídico inespecífico de los receptores de AII y tiene cierta acción agonista. Por su parte, el losartán es un antagonista no peptídico específico de los receptores AT₁, receptores que median casi todas las acciones fisiológicas conocidas de la AII. Para analizar la interacción PNA-SRA hemos utilizado dos modelos de hipertensión arterial experimental dependientes del SRA, la hipertensión renovascular dos riñones-un clip (2R-1C) y la hipertensión por déficit de óxido nítrico (NO) tras la administración de un inhibidor de su síntesis, el L-NAME.

La hipertensión renovascular 2R-1C en su fase aguda es dependiente del SRA. El efecto de la saralasinina en esta fase diferencia dos subgrupos. El primero, de animales saralasinina-sensibles, en los que la saralasinina tiene un mayor efecto hipotensor y el segundo, o de animales saralasinina-resistentes, cuya hipertensión tiene un componente de volumen además de una moderada activación del SRA. Se ha demostrado que la concentración y sensibilidad de los receptores de PNA en el riñón clipado y no clipado son diferentes en los dos grupos y ésto puede

determinar un diferente efecto del PNA. Por otro lado, en las hipertensiones dependientes de volumen, que presentan concentraciones más altas de PNA plasmático, se necesitan mayores cantidades de PNA exógeno para producir los mismos efectos que en las hipertensiones dependientes del SRA.

El NO, que se secreta basalmente y tras activación por multitud de factores, regula el tono vascular y la PA. La administración crónica de análogos de la L-Arginina, como el L-NAME, provoca una hipertensión por déficit crónico de NO (hipertensión L-NAME). La AII tiene un papel determinante en este tipo de hipertensión, ya que la administración de antagonistas de los receptores AT1 revierte o previene su desarrollo.

En primer lugar nos propusimos determinar el efecto que cada uno de los dos bloqueantes de los receptores de AII produce en los dos modelos de hipertensión. Así, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido:

1. Estudiar los efectos cardiovasculares de los antagonistas de los receptores de la AII, saralasin y losartán, en la hipertensión 2R-1C e hipertensión L-NAME.

Una vez analizada la respuesta cardiovascular a los dos antagonistas, el paso siguiente fue el de estudiar el efecto directo del PNA en cada uno de los dos modelos de hipertensión. Por lo tanto, el segundo objetivo fue:

2. Determinar los efectos cardiovasculares del PNA en la hipertensión 2R-1C y L-NAME.

Tras conocer las respuestas individuales de los bloqueantes de los receptores de AII y del PNA, nos propusimos analizar la interacción entre ambos. Para ello, hemos analizado si el efecto del PNA es modificado por el tratamiento previo, de forma aguda, con dichos antagonistas. Además, también hemos comprobado si el efecto de la saralasin es diferente tras la administración previa del PNA. Por consiguiente, el tercer objetivo ha sido:

3. Determinar los efectos cardiovasculares del PNA en la hipertensión 2R-1C y L-NAME

tras el bloqueo agudo del SRA con saralasinina o losartán.

Por último, hemos intentado averiguar si podía existir una diferente interacción entre el PNA y el SRA distinta a la analizada en el objetivo anterior con el bloqueo agudo de los receptores de AII, tras el tratamiento crónico con esos bloqueantes. Es evidente que la administración crónica de una droga produce efectos distintos a los de la administración aguda, sobre todo si, como se ha descrito, estos bloqueantes pueden prevenir el desarrollo de la hipertensión. Debido a la dificultad que entraña la administración crónica de saralasinina (debe ser intravenosa), para este estudio sólo se ha utilizado el losartán. Por ello, el cuarto y último objetivo fue:

4. Analizar los efectos cardiovasculares del PNA en la hipertensión 2R-1C y L-NAME tras el bloqueo crónico del SRA con losartán.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el Convenio Europeo sobre la protección de animales utilizados para experimentación (Estrasburgo, 18 de marzo de 1986, ratificado en España el 25 de octubre de 1990) y con el RD 233/1988 del 14 de marzo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España sobre la protección de los animales destinados a fines experimentales y otras funciones científicas.

Se han utilizado ratas Wistar macho procedentes del Animalario de la Universidad de Murcia (Centro Usuario en la actividad de cría con N° de registro del M.A.P.A.: 30030-2AB), sanos y de un peso inicial de 180 a 220 gramos.

II. HIPERTENSION VASCULORRENAL 2 RIÑONES-1CLIP (2R-1C).

1. Inducción de la Hipertensión vascularrenal 2R-1C.

La Hipertensión vascularrenal experimental se induce quirúrgicamente en ratas Wistar macho de 180-220 g. de peso. Mediante anestesia con Rompún (Clorhidrato de 2-[2,6-xilidino]-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina, 0.5 ml/kg, i.m.; Bayer) e Imalgène 1000 (Clorhidrato de ketamina y clorbutol, 0.5 ml/kg, i.m.; Rhône Mérieux) se prepara al animal bajo condiciones de asepsia para la intervención quirúrgica. A través de una incisión en el flanco izquierdo de la pared abdominal se accede al riñón izquierdo. Se disecciona cuidadosamente la arteria renal y se coloca un clip de plata con una separación interna de las ramas de 0.2 mm. Para concluir la intervención se sutura la herida por planos. Para prevenir las infecciones postoperatorias se administró una combinación antibiótica de gentamicina y ampicilina (0.1 ml/100g), por vía subcutánea (Bi-Gentavetina; Schering Plough, Segre, Francia). Los experimentos se realizaron 3 semanas después de la cirugía.

2. Diagnóstico de hipertensión vascularrenal 2R-1C.

Hemos considerado que los animales clipados eran hipertensos cuando, después del periodo de estabilización de una hora, su PAM era igual o superior a 140 mmHg. Una vez finalizado el experimento y sacrificado el animal, se extrajeron los dos riñones y, limpios de la grasa perirrenal, se pesaron.

3. Test de la saralasinina.

Tras comprobar que el animal es hipertenso se le inyecta un bolo de 50 ng de AII (AII sal de acetato; Sigma Chemical, CO) a través del catéter de la vena femoral para registrar el incremento de PA. Después de un periodo de espera de 15 minutos se inicia una infusión continua de saralasinina (10 µg/kg/min, [Sar¹, Ala⁸]-Angiotensin II; Sigma Chemical CO.), de 30 minutos de duración, a través del catéter de la vena femoral. A mitad de este periodo se comprueba el bloqueo con un nuevo bolo de AII (50 ng). La infusión se realizó a una velocidad de 1.2 ml/h con una bomba de infusión de jeringas modelo 22 (Harvard Apparatus). En este momento se determina la sensibilidad o resistencia a la saralasinina. Cuando el descenso de PAM es igual o mayor a 25 mmHg (test saralasinina positivo) se considera *saralasinina-sensible* y cuando es menor (test saralasinina negativo) *saralasinina-resistente*.

Hemos adoptado este criterio después de una consulta bibliográfica de estudios donde se establece esta diferenciación. No existe unanimidad a la hora de determinar la sensibilidad o resistencia a la saralasinina. Volpe y cols. (1985, 1986) determinan un descenso de más de 10 mmHg en la PAM para establecer la dependencia de renina del modelo 2R-1C. García y cols. (1987) establecen que con un descenso en la PAM de 30 mmHg o más se considera saralasinina-sensible y con un descenso de 10 mmHg o menos se considera saralasinina-resistente. García y cols. (1988) catalogan de saralasinina-sensible cuando la PAM disminuye 25 mmHg o más y saralasinina-resistente cuando disminuye 10 mmHg o menos. En estos dos últimos trabajos se eliminan del estudio aquellos animales en los que el descenso de PAM se encuentra entre 30 y

10 mmHg o entre 25 y 10 mmHg.

Nosotros hemos considerado útil nuestro criterio ya que nos separa y define perfectamente dos grupos con características propias dentro de la hipertensión 2R-1C.

III. HIPERTENSIÓN ARTERIAL POR INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO.

1. Inducción de la hipertensión arterial L-NAME crónica.

Ratas Wistar macho de 180 a 220 gramos, fueron tratadas con la administración oral crónica de L-NAME (Clorhidrato de N-Nitro-L-argininato de metilo; Fluka) a una dosis de 40 mg/Kg/día en el agua de bebida. Esta dosis se ajustó diariamente mediante el control de la bebida.

2. Diagnóstico de hipertensión.

Hemos considerado que los animales eran hipertensos cuando tras un periodo de estabilización de 1 hora la PAM era igual o superior a 140 mmHg.

IV. DETERMINACIONES HEMODINÁMICAS.

Como la preparación quirúrgica y las determinaciones hemodinámicas son iguales para todos los protocolos experimentales se van a exponer aquí y no en el apartado correspondiente a los protocolos.

1. Preparación quirúrgica.

Tras la anestesia con Rompún y Ketamina (0.5+0.5 ml/kg,i.m.) se prepara al animal bajo condiciones de asepsia para la intervención quirúrgica. En primer lugar y tras una incisión inguinal se introduce un catéter (PE 50) por la arteria femoral izquierda, haciéndolo progresar hasta aorta abdominal, para medir PA y FC y para la recogida de sangre. Seguidamente se

introduce otro catéter (PE 50) en vena femoral izquierda para la infusión de los fármacos. Posteriormente, a través de una incisión en la parte ventral del cuello se cateteriza la vena yugular derecha y se lleva un catéter de silicona (Silastic, Dow Corning) hasta su entrada en aurícula derecha para la inyección de suero salino isotónico al 0.9% (Grifols). Por último, se introduce en la arteria carótida derecha un termopar (Columbus Instruments, Ohio), necesario para la medida del GC por termodilución, y se avanza hasta que su punta esté colocada en aorta ascendente, momento en el que se obtiene una curva de termodilución de morfología típica.

Todos los catéteres se inmovilizan por medio de sutura a las arterias o venas y al plano muscular y se exteriorizan, por un trayecto subcutáneo realizado con la ayuda de un trócar, entre las escápulas. Posteriormente se introducen dentro de un muelle flexible de acero, suturado a la piel del animal, que va unido por el otro extremo a un sistema giratorio que permite al animal libertad de movimientos sin obstruir ninguno de los catéteres. Los catéteres están rellenos de suero salino heparinizado (50 U.I./ml, Heparina 5%; Rovi) para evitar su obstrucción. Para prevenir infecciones postoperatorias, se administró una combinación antibiótica de gentamicina y ampicilina (0.1 ml/100g) por vía subcutánea. Finalmente, los animales son colocados en jaulas individuales donde tienen libre acceso a comida y agua y se les permite recuperarse de la cirugía durante 24 horas.

2. Obtención de medidas.

Las mediciones hemodinámicas se realizaron utilizando el sistema microcomputerizado Cardiomax-II, modelo 85, conectado con un ordenador PC-compatible, con el programa lógico Cmx/IBM interface v.2.0 (Columbus Instruments; Columbus, Ohio). El GC se midió por termodilución. Existe una buena correlación entre la medición electromagnética del flujo y la termodilución (Osborn y cols., 1986).

El día del experimento se coloca al animal junto al aparato, se conecta el catéter arterial a

un transductor de presión (Bell and Howell 4-327-I; California) y el termopar al terminal que para él existe en el Cardiomax-II. De esta forma están continuamente monitorizadas la presión arterial sistólica, diastólica y media y la temperatura central del animal.

Para medir el GC se inyecta un bolo de 0.2 ml de solución salina estéril (NaCl 0.9%; Grifols) a temperatura ambiente (20 °C) en la aurícula derecha a través del catéter yugular, utilizando una jeringa especialmente diseñada para proporcionar volúmenes prefijados de líquido a velocidad constante (Hamilton, CR700-200; Hamilton CO., Reno- Nevada). Así, el programa lógico obtiene una curva de termodilución que aparece registrada en la pantalla del ordenador de la que el Cardiomax-II calcula el GC integrando el área de la curva con respecto al tiempo. A partir de estos datos el aparato calcula el VS y las RPT. Sólo se utilizan las curvas de morfología adecuada ya que el programa es capaz de discriminar las curvas inadecuadas. Las medidas se repitieron tres veces en cada determinación, obteniéndose la media de ellas. A partir de los datos que nos proporciona el aparato hemos calculado el índice cardíaco (IC), el índice de volumen sistólico (IVS) y el índice de resistencias periféricas totales (IRPT) por 100 gramos de peso del animal mediante las siguientes fórmulas:

* $IC = GC \cdot 100 / \text{peso del animal en gramos.}$

* $IVS = VS \cdot 100 / \text{peso del animal en gramos.}$

* $IRPT = PAM / IC.$

Las unidades de las variables utilizadas se recogen en la siguiente tabla:

PESO	gramos (g)	VS	$\mu\text{l.}100\text{g/lat}$
PAM	mmHg	RPT	$\text{mmHg. min/ml.}100\text{g}$

FC	lat/min	Hto.	%
IC	ml.100g/min	VOLUM	ml.100g

3. Determinación del valor hematocrito.

Para determinar el hematocrito se recogen en cada determinación dos muestras de sangre arterial, desde el catéter situado en la arteria femoral, en unos tubos capilares para microhematocrito de aproximadamente 75 µl de capacidad, heparinizados con NH₄ (Brand, Alemania). Estos tubos son centrifugados a 12000 rpm. durante 5 minutos (Centrífuga de microhematocrito Hermle, Z 230 HA, Alemania) y en un lector de hematocrito se obtiene el porcentaje (%) que corresponde a las células rojas.

V. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN SANGUÍNEO.

Para la determinación del volumen sanguíneo se empleó la técnica de dilución del colorante con el T-1824 o Azul de Evans (Merck, Sharp & Dohme, NJ, USA), que se une a proteínas plasmáticas. Esta técnica, previamente descrita en la bibliografía (Wang, 1959) y ampliamente desarrollada en nuestro Departamento (Inglés, 1991), consiste en la inyección de una cantidad conocida de colorante y obtención de plasma tras un periodo de tiempo definido, que ha de ser el mismo en todos los casos. El valor de absorvancia se transforma en el volumen plasmático verdadero mediante la utilización de una curva estándar previamente calculada y cuya descripción realizaremos más adelante. Una vez determinado el volumen plasmático y el hematocrito, podremos averiguar el volumen sanguíneo mediante la siguiente fórmula:

$$VS = VP \times \frac{\text{absorbancia}}{100 - [\text{Hto} \times F]}$$

donde VS (ml), es el volumen sanguíneo; VP (ml), el volumen plasmático; Hto (%), el hematocrito; y F, el factor de corrección por el plasma atrapado, cuyo valor, obtenido de la literatura, es de 0.8 (Wang, 1959).

1. Realización de la curva estándar.

La realización de la curva estándar resulta necesaria para la determinación del volumen plasmático y se obtiene relacionando cantidades crecientes de plasma con medidas de absorbancia del colorante disuelto en dicho plasma.

De 5 ratas hipertensas 2R-1C sensibles y 5 resistentes se extrae 1.5 ml de sangre arterial, de cada animal, que fueron centrifugados (Criocentrífuga, Heraeus-Christ) durante 30 minutos a 3000 rpm, a una temperatura de 4°C, para la obtención del plasma. Se distribuyó el plasma en tubos desde 0.5 ml (tubo 1) hasta 1.7 ml (tubo 7), aumentando cada tubo 0.2 ml. Además, se prepararon 2 blancos con 0.1 ml de plasma. A continuación se añadió, en cada tubo, 0.03 ml de solución de Azul de Evans al 0.451 %, mezclándose con un agitador (Rez x 2000, Heidolph). De cada uno de los tubos se extrajeron dos muestras de 0.1 ml y fueron diluidas al 10 % con suero salino isotónico. Se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro (VARIAN-634) a una longitud de onda de 605 nm, que es la de mayor absorbancia para el Azul de Evans. Como de cada concentración originaria se obtuvieron dos muestras, se adoptó como valor definitivo para cada concentración plasmática la media aritmética de ambas. Las lecturas obtenidas fueron multiplicadas por 10 debido a que la dilución realizada fue del 10 %. Con estos valores se construye la curva estándar, con los valores de absorbancia en abscisas y el volumen en ordenadas. Un análisis de regresión nos proporciona la ecuación de la curva.

2. Curvas de dilución.

Una vez constuida la curva estándar, sobre la que se trasladarán los resultados, se determinó la volemia basal de los dos grupos de estudio. Para ello se utilizan 5 animales hipertensos sensibles y 5 resistentes con las mismas características que los utilizados para la obtención de la curva estándar.

Se tomaron, a través del catéter arterial, dos muestras de 0.3 ml de sangre, en un tubo Eppendorf, para los blancos. Estos tubos son depositados en un vaso de precipitado con hielo granizado. Del mismo modo se obtuvieron dos muestras de sangre para la determinación del hematocrito (como ya se ha explicado en el apartado IV.3). A continuación se inyectaron 0.3 ml de solución de Azul de Evans al 0.451 %, (tiempo 0). A los 10 minutos se extraen 0.5 ml de sangre en tubos Eppendorf. Las cuatro muestras se centrifugan durante 30 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Del plasma obtenido se extraen muestras dobles de 0.1 ml, diluyéndose al 10 %. El contenido de los tubos se mide en el espectrofotómetro de doble haz a una longitud de onda de 605 nm, en oposición al blanco (muestra tiempo 0). Este valor se convierte en un valor de volumen plasmático mediante la ecuación de la curva estándar. Para la determinación del volumen sanguíneo se utilizó la fórmula expuesta al principio de este apartado.

VI. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

1. EFECTOS HEMODINÁMICOS DE LA SARALASINA.

1.1 Grupos experimentales.

- **Grupo Control.** Formado por 6 ratas de edad y peso similares a las hipertensas.
- **Grupo 2R-1C sensibles.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin positivo.

- **Grupo 2R-1C resistentes.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasinina negativo.
- **Grupo NAME crónico.** Formado por 6 ratas que recibieron L-NAME.

1.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al transductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que estabilice sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se inicia la infusión de 60 minutos de saralasinina (10 µg/kg/min) a una velocidad de 1.2 ml/min, a través del catéter colocado en la vena femoral con una bomba de infusión para jeringas modelo 22 (Harvard Apparatus). En los minutos 30 y 60, se vuelven a tomar nuevas determinaciones hemodinámicas, tal como se muestra en el siguiente esquema:

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos	60 minutos
	Basal	Saralasinina	Saralasinina

2. EFECTOS HEMODINÁMICOS DEL LOSARTÁN.

2.1 Grupos experimentales.

- **Grupo control.** Formado por 6 ratas de edad y peso similares a las hipertensas.
- **Grupo 2R-1C.** Formado por 6 ratas hipertensas.
- **Grupo NAME crónico.** Formado por 6 ratas que recibieron L-NAME.

2.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al transductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que establezca sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se administra un bolo de losartán (10 mg/kg; Merck) a través del catéter colocado en la vena femoral. A los 30 y 60 minutos de la administración del bolo se tomaron las correspondientes determinaciones hemodinámicas.

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos	60 minutos
	Basal	losartán	losartán

3. EFECTOS HEMODINÁMICOS DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO AURICULAR (PNA).

3.1 Grupos experimentales.

- **Grupo control.** Formado por 6 ratas de edad y peso similares a las hipertensas.
- **Grupo 2R-1C sensibles.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin positivo.
- **Grupo 2R-1C resistentes.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin negativo.
- **Grupo NAME crónico.** Formado por 6 ratas que recibieron L-NAME.

3.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al

trasductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que establezca sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se infundirá el PNA (1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) a una velocidad de 1.2 ml/hora durante 30 minutos a través del catéter de la vena femoral. Al final de los 30 minutos se tomarán las determinaciones hemodinámicas.

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos
	Basal	PNA

4. EFECTOS HEMODINÁMICOS DEL PNA EN ANIMALES PRETRATADOS CON SARALASINA.

4.1 Grupos experimentales.

- **Grupo control.** Formado por 6 ratas de edad y peso similares a las hipertensas.
- **Grupo 2R-1C sensibles.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin positivo.
- **Grupo 2R-1C resistentes.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin negativo.
- **Grupo NAME crónico.** Formado por 5 ratas que recibieron L-NAME.

4.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al trasductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que establezca sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se inicia la infusión de 60 minutos de saralasin (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) a una velocidad de 1.2 ml/min, a través del catéter colocado en la

vena femoral. A los 30 minutos de iniciarse la infusión se tomarán las determinaciones hemodinámicas. Inmediatamente después se infundirá el PNA (1.5 µg/kg/min) a una velocidad de 1.2 ml/hora durante 30 minutos también a través del catéter de la vena femoral colocando una derivación en Y para que puedan infundirse ambas drogas al mismo tiempo. Al final se vuelven a determinar las variables hemodinámicas.

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos	60 minutos
	Basal	Saralasin	Saralasin + PNA

5. EFECTOS HEMODINÁMICOS DE LA SARALASINA EN ANIMALES PRETRATADOS CON PNA.

5.1 Grupos experimentales.

- **Grupo 2R-1C sensibles.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin positivo.
- **Grupo 2R-1C resistentes.** Formado por 8 ratas hipertensas con test de saralasin negativo.

5.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al transductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que estabilice sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se inicia la infusión de 60 minutos de PNA (1.5 µg/kg/min) a una velocidad de 1.2 ml/min, a través del catéter colocado en la vena femoral. A los 30 minutos de iniciarse la infusión se tomarán las determinaciones hemodinámicas. Inmediatamente después se infundirá saralasin (10 µg/kg/min) a una velocidad

de 1.2 ml/hora durante 30 minutos también a través del catéter de la vena femoral colocando una derivación en Y para que puedan infundirse ambas drogas al mismo tiempo. Al final se vuelven a determinar las variables hemodinámicas.

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos	60 minutos
	Basal	PNA	PNA + Saralasin

6. EFECTOS HEMODINÁMICOS DEL PNA EN ANIMALES PRETRATADOS CON LOSARTÁN.

6.1 Grupos experimentales.

- **Grupo control.** Formado por 6 ratas de edad y peso similares a las hipertensas.
- **Grupo 2R-1C.** Formado por 5 ratas hipertensas.
- **Grupo NAME crónico.** Formado por 5 ratas que recibieron L-NAME.

6.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al transductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que estabilice sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se administra un bolo de losartán (10 mg/kg) a través del catéter colocado en la vena femoral. A los 30 minutos se tomarán las determinaciones hemodinámicas. Inmediatamente después se infundirá el PNA (1.5 µg/kg/min) a

una velocidad de 1.2 ml/hora durante 30 minutos a través del catéter de la vena femoral, al final de los cuales se vuelven a determinar las variables hemodinámicas.

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos	60 minutos
	Basal	losartán	losartán + PNA

7. EFECTOS HEMODINÁMICOS DEL PNA EN ANIMALES TRATADOS CRÓNICAMENTE CON LOSARTÁN.

7.1 Grupos experimentales.

- **Grupo control + losartán crónico.** Formado por 7 ratas de edad y peso similares a las hipertensas que bebieron durante unos 15 días antes del experimento agua con losartán (10 mg/kg/día).

- **Grupo 2R-1C + losartán crónico.** Formado por 6 ratas que desde el mismo instante en que se cliparon sus arterias renales izquierdas hasta el día del experimento bebieron agua que contenía losartán (10 mg/kg/día).

- **Grupo NAME crónico + losartán crónico.** Formado por un grupo de 4 ratas que bebieron agua que contenía L-NAME (40 mg/kg/día) y losartan (10 mg/kg/día) durante unos 19 días.

7.2 Proceso experimental.

Una vez colocado el animal junto al Cardiomax-II y conectados el catéter arterial al transductor de presión y el termopar al terminal del Cardiomax-II, se deja al animal que estabilice sus constantes durante al menos una hora. En este momento se tomaron los datos basales de

PAM, GC, VS, FC, RPT y hematocrito. A continuación se infundirá el PNA (1.5 µg/kg/min) a una velocidad de 1.2 ml/hora durante 30 minutos a través del catéter de la vena femoral. Al final de los 30 minutos se tomarán las determinaciones hemodinámicas.

60 minutos de estabilización	0 minutos	30 minutos
	Basal	PNA

VII. COMPROBACIÓN DEL GRADO DE BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA.

El grado de bloqueo de la saralasin se comprobó mediante la administración de un bolo i.v. de 50 ng de angiotensina II antes y 60 minutos después de administrar la dosis empleada de saralasin (10 µg/kg/min).

El grado de bloqueo conseguido con la administración aguda de losartán se comprobó mediante la administración de un bolo i.v. de 50 ng de angiotensina II antes y 60 minutos después de administrar la dosis empleada de losartán (10 mg/kg).

El grado de bloqueo conseguido tras la administración crónica de losartán se realizó en el momento del experimento, mediante la administración de un bolo i.v. de 50 ng de angiotensina II.

VIII. METODOS ESTADÍSTICOS.

Los datos se expresan como la media ± 1 error estándar. Para la comparación de los datos dentro de un mismo grupo se ha usado un análisis de varianza simple para medidas repetidas, y para la comparación de medidas entre grupos un análisis de varianza doble, también para

medidas repetidas. En el caso de alcanzar una significación estadística, las comparaciones dos a dos se han determinado con un test de Duncan. Para la determinación de la significación estadística, se ha tomado el valor de probabilidad p menor de 0.05.