UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DEHIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

# "INFLUECIA DE LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL Y DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL SOBRE LA RESPUESTA PRESORA PERIFÉRICA A LA ANGIOTENSINA II"

TESIS QUE PRESENTA EL:

Q.F.B. EDGAR SAÚL FIGUEROA GUILLÉN

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DIRECTORES DE LATESIS:

DR. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ

DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS

MORELIA, MICHOACÁN FEBRERO DE 2010

Esta tesis fue asesorada por el D. C. Daniel Godínez Hernández en el laboratorio de Farmacología del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH y co-asesorada por el D. C. Maximiliano Ibarra Barajas del laboratorio de Farmacología Cardiovascular, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM,

La parte experimental de esta investigación se llevo a cabo en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios S uperiores Iztacala UNAM bajo la asesoria del D. C. Maximiliano Ibarra Barajas.

Para la realización de este trabajo se contó con la beca de Maestría 231531 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Y también fue apoyada por PAPIIT IN223009, DGAPA UNAM, PAPCA 2009 FES-Iztacala UNAM, CIC-UMSNH-2008, COECyT-FIFOECyT-2008 y PROMEP PTC-156, UMSNH.

# AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES:

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

A MIS SINODALES:

D. C. Carlos Cervantes Vega, D. C. Rosalío Mercado y el D. C. Salvador Manzo Ávalos, por sus aportaciones que fortalecieron en gran medida este trabajo de investigación.

Particularmente al equipo de trabajo del laboratorio del Dr. Max: Itzell A. Gallardo, Patricia Castro y Juan Javier López, quienes contribuyeron con sus conocimientos, apoyo y tiempo para llevar a cabo la realización experimental de esta tesis.

A cada uno de mis grandes amigos y amigas, que me acompañan en todo momento y nunca dejaron de darme su apoyo y cariño: Christian, Edith, Antonio, Rocío, Jaime, Ma. Edith, Blanca, Angélica, Llanelly Lourdes, Karina, Diana, Leslie, Guadalupe, Marcos, Esther, Areli, Cesar, Vianey y David.

# DEDICATORIA

*Este trabajo es dedicado a mi familia, especialmente a mis padres a los cuales les debo todo los que soy hoy en día. A ti mama por ayudarme a construir cada uno de mis sueños y por ser una mujer excepcional. A mi papa, hermanos y tíos por siempre brindarme su apoyo incondicional.*

# INDICE GENERAL

PAG

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

**I. INTRODUCCIÓN**..... 1
1. 1. Diabetes mellitus: generalidades..... 1
1. 1. 1. Clasificación de la diabetes mellitus..... 3
1. 1. 1. 1. Diabetes mellitus tipo 1..... 3
1. 1. 1. 2. Diabetes mellitus tipo 2..... 3
1. 1 .1. 3. Otros tipos de diabetes..... 4
1. 2. Enfermedades cardiovasculares..... 4
1. 2. 1. Principales factores de riesgo..... 5
1. 2. 2. Hipertensión arterial..... 6
1. 3. Síndrome metabólico..... 8
1. 4. La Diabetes mellitus como factor de riesgo para la hipertensión arterial..... 9
1. 5. Regulación de la presión arterial..... 12
1. 6. El sistema renina angiotensina..... 15
1. 6. 1. Mecanismo vasoconstrictor de la angiotensina II..... 16
1. 6. 2. El receptor AT1..... 18
1. 6. 3. El receptor AT2..... 18
1. 6. 4. El sistema renina angiotensina en la diabetes mellitus y en la hipertensión arterial..... 19
1. 7. Deficiencia de óxido nítrico en la en la hipertensión arterial..... 22
**II. JUSTIFICACIÓN**..... 24
**III. HIPÓTESIS**..... 25
**IV. OBJETIVO GENERAL**..... 25
**V. OBJETIVOS PARTICULARES**..... 25
**VI. MATERIALES Y MÉTODOS**..... 26
6. 1. Animales..... 26
6. 2. Grupos experimentales..... 26
6. 3. Valoración de la presión arterial y la glucosa..... 26
6. 4. Preparación del modelo de rata descerebrada y desmedulada..... 27
6. 5. Respuestas presoras a la angiotensina II..... 28
6. 6. Análisis estadístico..... 28
**VII. RESULTADOS**..... 30
7. 1. Glucosa sanguínea..... 30

7. 2. Presión arterial..... 30
7. 3. Efecto del captopril sobre la presión arterial..... 32
7. 4. Curvas dosis-respuesta a la angiotensina II..... 34
7. 5. Efecto del captopril sobre la curva dosis-respuesta a la angiotensina II..... 34
7. 6. Antagonismo del losartán..... 37
**VIII. DISCUSIÓN**..... 40
8. 1. Hiperreactividad a la angiotensina II..... 40
8. 2. Efecto del losartán sobre la repuesta a la angiotensina II..... 45
**IX. CONCLUSIÓN**..... 48
**X. BIBLIOGRAFIA**..... 49
**XI. ANEXO**..... 58

# ÍNDICE DE FIGURAS


| | | PÁG |
|---|---|---|
| **Figura 1.** | Beneficios de la terapia antihipertensiva (ARA's, losartán), en pacientes diabéticos..... | 11 |
| **Figura 2.** | Principal circuito en la regulación de la presión arterial..... | 13 |
| **Figura 3.** | Sistema renina angiotensina (SRA) clásico..... | 15 |
| **Figura 4.** | Curso temporal de la glucosa sanguínea en los grupos control, captopril, HA, HA/captopril, DM, DM/HA y DM/HA/captopril..... | 31 |
| **Figura 5.** | Curso temporal de la presión arterial sistólica (PAS)..... | 32 |
| **Figura 6.** | Curso temporal del efecto del captopril sobre la PAS..... | 32 |
| **Figura 7.** | Curva dosis-respuesta a la angiotensina II (ANG II) en el modelo de rata descerebrada y desmedulada, en animales de los grupos: controle, HA, DM y DM/HA..... | 35 |
| **Figura 8.** | Efecto del captopril sobre las curvas dosis-respuesta a la ANG II en rata descerebrada y desmedulada..... | 36 |
| **Figura 9.** | Efecto del losartán sobre la curva dosis-respuesta a la ANG II en rata descerebrada y desmedulada..... | 38 |
| **Figura 10.** | Efecto del losartán sobre la curva dosis-respuesta a la ANG II en rata descerebrada y desmedulada (grupos diabéticos)..... | 39 |


# INDICE DE TABLAS


| | | PAG. |
|---|---|---|
| **Tabla 1.** | Clasificación de la hipertensión arterial. ..... | **7** |
| **Tabla 2.** | Beneficios del bloqueo del SRA con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA's) en pacientes con diabetes mellitus..... | **20** |
| **Tabla 3.** | Beneficios del bloqueo del SRA con antagonistas del receptor $AT_1$ (ARA's) en pacientes con diabetes Mellitus ..... | **21** |

# Abreviaturas

ANG I .....Angiotensina I

ANG II.....Angiotensina II

ARA's.....Agonistas del receptor a la angiotensina

$AT_1$.....Receptor tipo 1 de la angiotensina II

$AT_2$.....Receptor tipo 2 de la angiotensina II

DM.....Diabetes mellitus

DM1.....Diabetes mellitus tipo 1

DM2.....Diabetes mellitus tipo 2

ECA.....Enzima convertidora de angiotensina

ECV.....Enfermedades cardiovasculares

$E_{max}$.....Efecto máximo

HA.....Hipertensión arterial

IECA's .....Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

L-NAME.....$N_W$-nitro-L-arginina metil éster

NO.....Óxido nítrico

$pD_2$.....Sensibilidad ($CE_{50}$)

SNC.....Sistema nervioso central

SRA.....Sistema renina angiotensina

# RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo y entre las principales causas para presentar ECV encontramos a hipertensión arterial (HA) y diabetes mellitus (DM). Estas enfermedades a menudo se presentan en conjunto y conllevan a complicaciones en órgano blanco como el corazón, el cerebro, el riñón y la vasculatura. estas complicaciones son las causas principales de mortalidad.

El sistema renina angiotensina, es uno de los principales mecanismos de regulación de la homeostasis cardiovascular, de la regulación de los electrolitos y de los fluidos y se ha implicado como un agente causal en el desarrollo de la HA. La angiotensina II (Ang II) al ser el mediador más importante de este sistema, tiene una participación importante en la homeostasis renal y cardiovascular, mediando sus efectos fisiológicos y fisiopatólogicos a través de dos tipos de receptores específicos, principalmente por el receptor $AT_1$.

En el presente trabajo se determinó la participación de la Ang II sobre la respuesta periférica en el modelo de rata descerebrada y desmedulada, en etapas tempranas en la DM e HA.

Se emplearon ratas Wistar de 200 a 250 g y se dividieron en 8 grupos: (1) Control (agua de beber), (2) Captopril (20 mg/kg/día en el agua de beber), (3) Hipertenso (L-NAME 50 mg/kg/día en el agua de beber), (4) Hipertenso + Captopril, (5) Diabético (Estreptozotocina 55 mg/Kg i.p. única dosis 48 h antes del inicio del tratamiento), (6) Diabético + Captopril, (7) Hipertenso + Diabético. (8) Hipertenso + Diabético + Captopril. Se realizaron curvas dosis-respuesta a la ANG II en presencia y ausencia de losartán (1-3 mg/Kg) en el modelos de rata descerebrada y desmedulada.

A nivel funcional encontramos hiperreactividad a la angiotensina II en animales de todos los grupos con respecto al control, observado como un aumento en el efecto máximo (grupo HA) y una sensibilidad mayor a la Ang II (todos los tratamientos). Estos efectos fueron más marcados en los grupos que presentaron DM.

Además, se encontró que el receptor $AT_1$ participa, de manera importante, en la hiperreactividad a la angiotensina II, observándose un efecto más pronunciado en los grupos que se les administró captopril y en los grupos a los que se les indujo diabetes mellitus.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que tanto la diabetes mellitus como la hipertensión arterial inducen un aumento en la respuesta presora periférica a la Ang II. Se sugiere que receptor $AT_1$ se encuentra involucrado en la hipersensibilidad a la angiotensina II observada en todos los grupos experimentales.

# ABSTRAC

Cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide. Among the factors that contribute to present cardiovascular diseases are hypertension and diabetes. Often these diseases are presented together and they damage target organs like heart, brain, kidney and blood vessels, these complications are the main cause of mortality.

Renin-angiotensin system is one of the main mechanisms that regulate cardiovascular homeostasis, electrolytes and fluids and it has been implicated as a cause in hypertension development. Angiotensin II, the most important mediator of this system, play a central role in renal and cardiovascular homeostasis, mediating its physiological and patological effects through two kind of specifical receptors, being $AT_1$ the most important receptor.

In the present work, it was determined Ang II participation on peripherical response in pithed rat model, in early stages in diabetes and hypertension.

Wistar rats (200-250 g body weight) were divided in 8 groups: (1) Control (tap water), (2) Captopril (20 mg/kg/day in tap water), (3) Hypertensive rat (L-NAME 50 mg/kg/day in tap water), (4) Hypertensive rat + Captopril, (5) Diabetic rat (Streptozotocine 55 mg/Kg i.p. 48 h before start of treatment), (6) Diabetic rat + Captopril, (7) Hypertensive rat + Diabetic rat (8) Hypertensive rat + Diabetic rat + Captopril. Dose-response curves to Ang II were constructed in presence and absence of losartan (1-3 mg/Kg; an $AT_1$ receptor antagonist) in pithed rat model.

At functional level, we found hyperreactivity to angiontensin II in animals from all experimental groups compared to control, this change was observed as an increase in maximal effect (HA group) and a hypersensitivity in response to Ang II administration (all treatment groups), this effect was more pronounced in diabetic rat groups.

In addition, it was found that $AT_1$ receptor participate in angiotensin II hyperreactivity, importantly. This effect was more pronounced in captopril and diabetic rat groups.

Our results suggest that diabetes and hypertension induce Ang II hyperreactivity in L-NAME-induced hypertension involving AT1 receptors.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. 1. DIABETES MELLITUS: GENERALIDADES

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa caracterizada por un trastorno complejo en el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, debido a una deficiencia relativa o absoluta de la secreción de insulina en las células β del páncreas (Expert Committee on the Diagnosis and Treatment of Diabetes Mellitus, 2000).

En el mundo hay más de 220 millones de personas con diabetes y se calcula que en el 2005 fallecieron 1.1 millones de personas por esta patología, de las cuales, cerca del 80% se registraron en países de ingresos bajos y medios. El aumento en la morbilidad de la diabetes, a nivel mundial, es especialmente alarmante. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que el número de nuevos casos de diabetes aumentaran en el 2025 años a 330 millones de casos. Una gran parte de este aumento tendrá lugar en los países en vías de desarrollo, donde la edad, las dietas poco saludables, la obesidad y el estilo de vida sedentario contribuirán al incremento en las cifras de diabetes. En México, existen aproximadamente 6 millones de personas que son mayores de 20 años que padecen esta enfermedad (Olaiz et al., 2000).

La disminución de la secreción de insulina se debe a diversas condiciones, entre las que se incluyen: la reducción de la masa total de células β (en el caso de la

extracción quirúrgica del páncreas y en la pancreatitis aguda) o como consecuencia de la destrucción autoinmune de dichas células, relacionada con la presencia de anticuerpos bloqueadores de la acción de la hormona, fenómeno que ocurre en la diabetes tipo 1 (vea clasificación de diabetes mellitus) (Zierath et al., 2000). De manera adicional, algunos defectos genéticos en el metabolismo de las células β también pueden ocasionar deficiencia en la secreción de la insulina deficiente en respuesta a estímulos fisiológicos. En el caso de la diabetes tipo 2, el defecto básico es la resistencia a la acción de la insulina de los tejidos periféricos y, en menor grado, una deficiencia relativa de la secreción de la hormona. La mayoría de los expertos considera que la resistencia a la insulina es el fenómeno primario, mientras que la deficiencia en la secreción, aparece como resultado de la hiperglucemia sostenida y la sobre estimulación persistente de la célula β (Zierath et al., 2000; Shepherd P. R. and Kahn B. B., 1997).

La resistencia a la insulina se encuentra asociada, en mayor o menor grado, a una amplia gama de alteraciones metabólicas que implican, a largo plazo, riesgos graves para la salud. Es claro que existe una fuerte relación entre la presencia de obesidad y el desarrollo de resistencia a la acción de la insulina. Esta asociación determina la susceptibilidad de los sujetos obesos para desarrollar diabetes, de hecho, la obesidad parece ser la causa más común de resistencia a la insulina. Adicionalmente, se ha documentado una relación definida entre la obesidad de tipo androide (central, es decir, aquella en que el tejido adiposo se acumula en mayor cantidad en el abdomen) y una baja sensibilidad a la insulina (Zierath *et al.*, 2000).

### 1. 1. 1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

Actualmente, existen dos clasificaciones principales: la primera, corresponde a la OMS y sólo reconoce tres tipos de diabetes mellitus (tipo 1, tipo 2 y gestacional) y la segunda, propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (ADA; 2006), donde la diabetes mellitus se clasifica en tres grupos:

#### 1. 1. 1. 1. DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

Se presenta mayormente en individuos jóvenes, aunque puede aparecer en cualquier etapa de la vida y se caracteriza por la nula producción de insulina, debida a la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas mediada por las células T (Rother K. I., 2007).

#### 1. 1. 1. 2. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

Se caracteriza por un mecanismo fisiopatológico complejo, cuyo rasgo principal es el "déficit" relativo en la producción de insulina y una deficiente utilización de glucosa en los tejidos periféricos (resistencia a la insulina), es decir, los transportadores de la glucosa, que se encargan de introducir esta molécula a la célula, pueden estar dañados. Este tipo de diabetes a menudo se desarrolla en la etapa adulta de la vida y se asocia frecuentemente a la obesidad, por estas razones, anteriormente se conocía como diabetes del adulto o diabetes relacionada con la obesidad. Además, el tratamiento con varios fármacos y otros factores pueden causar este tipo de diabetes. En este sentido, es altamente frecuente que la diabetes

tipo 2 se asocie al tratamiento prolongado con corticoides, frecuentemente asociada a la hemocromatosis no tratada (Rother K. I., 2007). La diabetes tipo 2 se presenta entre el 80-90% de la totalidad de los pacientes diabéticos (Arias P., 2003).

#### 1. 1. 1. 3. OTROS TIPOS DE DIABETES

Otros tipos de diabetes mellitus incluyen a menos del 5% de los casos diagnosticados (Arias P., 2003). A pesar de su incidencia baja, no dejan de ser problemas de salud importantes y se enuncian a continuación:

- Diabetes mellitus gestacional.
- Tipo 3A: defectos genéticos en las células β.
- Tipo 3B: resistencia a la insulina determinada genéticamente.
- Tipo 3C: enfermedades del páncreas.
- Tipo 3D: causada por defectos hormonales.
- Tipo 3E: causada por compuestos químicos o por fármacos.

## 1. 2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (ECV)

Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que en el 2005 murieron por esta causa 17.5 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo y 7.6 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria y 5.7 millones a los accidentes vasculares cerebrales (AVC) (OMS, 2009).

Los ataques al corazón y los AVC suelen ser fenómenos agudos que se deben, sobre todo, a obstrucciones en los vasos sanguíneos que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro. La causa más frecuente de infarto cardiaco o cerebral es la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro. Los AVC también pueden deberse a hemorragias de los vasos cerebrales o a la formación de coágulos de sangre (OMS, 2009).

### 1. 2. 1. Principales factores de riesgo

La mayoría de las causas de las ECV están definidas y se conocen. Las causas más importantes de cardiopatía y AVC son los llamados "factores de riesgo modificables": una dieta inadecuada, la inactividad física y el consumo de tabaco. Los efectos de estos factores pueden manifestarse como "factores de riesgo intermedios": el aumento de la tensión arterial, la aparición de DM, alteraciones en los lípidos de la sangre, el sobrepeso y la obesidad (Paniagua *et al*., 2007; OMS, 2009). De manera interesante, los factores de riesgo modificables son responsables del 80% de los casos de cardiopatía coronaria y enfermedad cerebrovascular. También hay una serie de determinantes subyacentes de las enfermedades crónicas, es decir, "las causas de las causas", que son un reflejo de las principales fuerzas que rigen los cambios sociales, económicos y culturales, como son: la globalización, la urbanización, el envejecimiento de la población, la pobreza y el estrés (OMS, 2009.

**1. 2. 2. HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

La presión arterial alta (hipertensión arterial: HA) es un trastorno altamente frecuente. En México, existen más de 15 millones de personas con hipertensión arterial (comunicado de prensa SSA. No. 181, 2004), siendo ésta una enfermedad sistémica y un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades cardiovasculares y renales entre las que se encuentran la ateroesclerosis, el infarto al miocardio, la isquemia cerebral, el aneurisma y la hipertrofia cardiaca. En la HA, los pacientes cursan sin una sintomatología clara hasta que aparece una o varias de las complicaciones, de ahí que se le llame "el asesino silencioso".

La HA es un padecimiento crónico de etiología variada, que se caracteriza por el aumento sostenido de la presión arterial, con valores superiores a 140/90 mmHg (ver tabla 1). La HA es un trastorno hemodinámico (macro y micro vasculares) provocado por alteraciones en la producción de sustancias vasodilatadoras, vasoconstrictoras o ambas, que da como resultado un aumento en las resistencias vasculares periféricas (Sosa-Luna *et al*., 2005)

Alrededor del 90% de los casos de HA, la causa es aún desconocida, por lo cual se le ha denominado hipertensión arterial esencial, aunque presenta una fuerte influencia hereditaria. Ese porcentaje tan elevado justifica el intentar buscar la etiología, ya que sólo entre el 5 y el 10% de los casos existe una causa directamente responsable de la elevación de las cifras tensionales. A esta forma de hipertensión se la denomina hipertensión arterial secundaria (Zenteno J. C. and Kofman A. S., 2003).

**TABLA 1.** Clasificación de la hipertensión arterial. Se considera como hipertensión arterial los valores de presión arterial sistólica (PAS) mayores que 140 mm de Hg y de presión arterial diastólica (PAD) mayores que 90 mm de Hg. (Modificada de Chobanian *et al*., 2003).

| | PAS (mm Hg) | PAD (mm Hg) |
|---|---|---|
| Normotensión | < 120 | < 80 |
| Prehipertensión | 120-139 | 80-89 |
| Estadio 1 | 140-159 y/o | 90-99 |
| Estadio 2 | > 160 | > 100 |

La relevancia de la HA no reside en sus características como enfermedad, sino en el incremento del riesgo de padecer otras enfermedades cardiovasculares y renales. Las cifras tensionales altas junto con la hipercolesterolemia y el tabaquismo constituyen los principales factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis y para la aparición de otras enfermedades cardiovasculares.

Actualmente, 691 millones de personas –según estimados– son afectadas por la HA en el mundo y la prevalencia de esta patología, en la mayoría de los países, se encuentra entre el 15 y el 30%, y en la población mayor de 50 años casi el 50% la padece (Coca A., 1998). Esta enfermedad se relaciona con múltiples factores de índole económico, social, cultural, ambiental y étnico. El aumento en la prevalencia se asocia a patrones dietéticos, disminución de la actividad física y otros aspectos conductuales en su relación con los hábitos tóxicos.

En estudios epidemiológicos se ha concluido que varios factores de riesgo guardan relación con la HA, dentro de estos se citan la edad, el sexo, color de la piel, la herencia, las dietas ricas en sodio, los oligoelementos, factores socioculturales, el alcoholismo, tabaquismo, la hiperlipidemia y enfermedades como la cardiopatía isquemia, la enfermedad cerebrovascular y la diabetes mellitus (Cruz-Camacho M., 2001).

## 1. 3. SÍNDROME METABÓLICO

Se llama síndrome metabólico (también conocido como síndrome X) al conjunto de enfermedades o factores de riesgo, en un mismo individuo, que aumentan su probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus. La causa del síndrome metabólico se desconoce, la fisiopatología es extremadamente compleja. La mayoría de los pacientes con síndrome metabólico son de edad considerablemente muy adulta, son obesos, sedentarios y tienen cierto grado de resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina desempeña una participación central en la génesis de este síndrome. La hiperinsulinemia, es decir, una concentración elevada de insulina en el plasma sanguíneo, resulta ser un factor de riesgo independiente para la aparición de enfermedad cardiaca isquémica, ayuda a la aparición temprana de la diabetes y a su progresión subsecuente y contribuye a la aparición de otras patologías asociadas que se traducen en factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial (Harano *et al*., 2002).

## 1. 4. LA DIABETES MELLITUS COMO FACTOR DE RIESGO PARA LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La Encuesta Nacional de Salud (Olaiz et al., 2000) reportó que del total de la población hipertensa, el 16.4% presentó diabetes mellitus previamente al establecimiento de la HA, además, del total de la población diabética el 46.2% presentaron posteriormente hipertensión arterial.

En la diabetes mellitus tipo 1, la HA puede aparecer como la expresión de la nefropatía incipiente, a medida que ascienden los niveles de microalbuminuria, con la pérdida precoz del descenso tensional fisiológico nocturno. En la evolución de la nefropatía se elevan progresivamente tanto la PAS como la PAD y la excreción de albúmina (Ampudia-Blasco F. J. and Navarro J., 2000; Herrera-Pombo et al., 2005).

En la diabetes mellitus 2, el daño renal es menos uniforme y pueden apreciarse otras etiologías de la enfermedad renal crónica (nefropatía vascular hipertensiva, ateroembolia) y hasta en la tercera parte de los adultos con la DM2, recién diagnosticados, se presenta una enfermedad renal desarrollada previamente, con la HA y otros factores. Alrededor del 15% de los pacientes llegan a la insuficiencia renal terminal sin haber presentado albuminuria. Por lo tanto, la presencia de HA en etapas de prediabetes y en la DM es secundaria a una ECV y/o renal. En los diabéticos, es común ver disfunción autonómica que determina hipotensión ortostática con o sin hipertensión supina (Herrera-Pombo et al., 2005).

El tratamiento empleado para este tipo de pacientes es variado, sin embargo, en la actualidad se le da una mayor importancia a mantener un riguroso control de la

presión arterial que al control de la hiperglucemia, con el propósito de prevenir y reducir la aparición de enfermedades cardiovasculares (Chobanian et al., 2003; Sowers J. C., 2001). En este sentido, se ha observado que con el tratamiento antihipertensivo, disminuye en un 34.0% la aparición de enfermedades cardiovasculares. Los antihipertensivos que producen estos beneficios son (Ross S. and Macleod M. J, 2003):

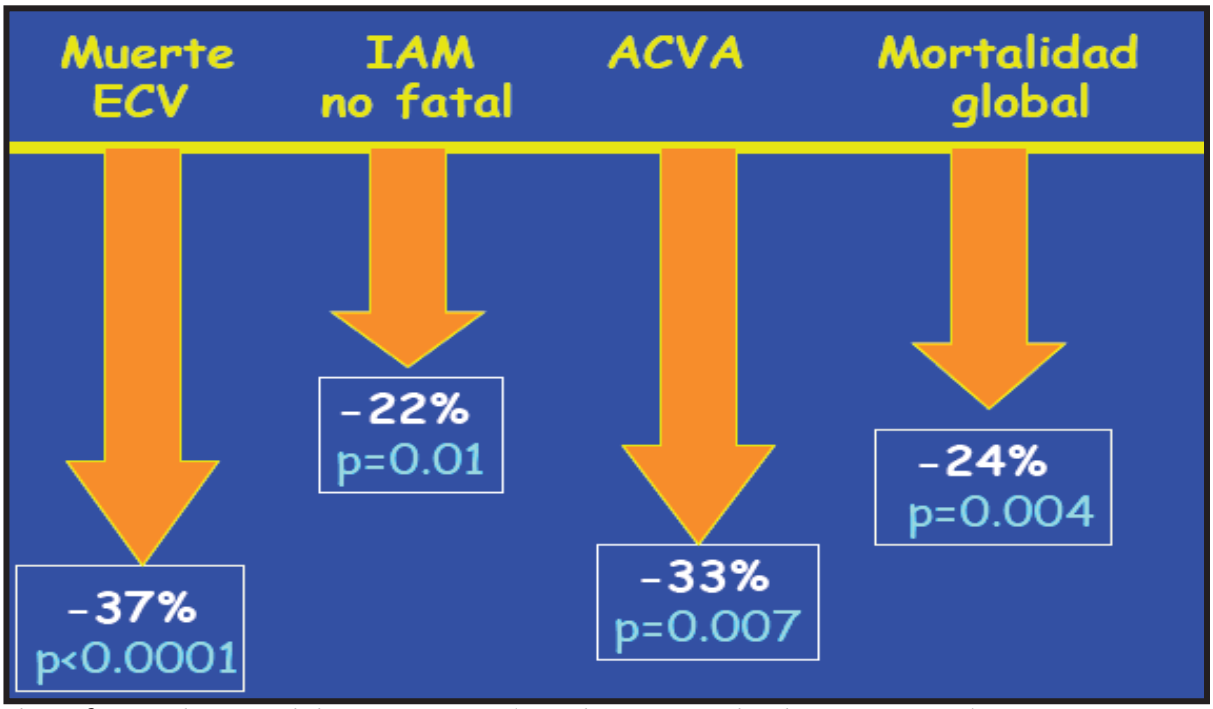
- Diuréticos tipo tiazida
- Antagonistas β-adrenérgicos
- Bloqueadores de los canales de calcio
- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA's)
- Antagonistas del receptor a la angiotensina $AT_1$ (ARA's).

Además, Sowers J. C., en el 2004 indica que en el caso de los tratamientos que intervienen en el sistema renina angiotensina tales como: los IECA's, ARA's e incluso los inhibidores de la renina, ayudan a controlar los niveles de presión arterial y brindan beneficios adicionales, principalmente un efecto protector renal.

La terapia antihipertensiva con los antagonistas del receptor $AT_1$, como el losartán, está asociada con la prevención de la insuficiencia renal terminal (Sowers J. C., 2004) y del desarrollo de hipertrofia cardiaca (Fig. 1) (Schmieder *et al*., 2007).

En pacientes diabéticos-hipertensos cuya hipertensión se trata con IECA's, tipo captopril, los reportes indican que hay una disminución del 48% de muerte, de diálisis o trasplante de riñón (Levis *et al*., 1993), una reducción del 50% de los niveles de creatinina sérica (Sowers J. C., 2004), así como una reducción en la tasa de progresión de la albuminuria. Además, se ha reportado que los IECA's elevan los

niveles de bradicinina, la cual estimula la producción de óxido nítrico, prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio, que pueden potenciar los




beneficios clínicos del tratamiento (Deedwania-Prakash C. M., 2000).

Fig. 1. Beneficios de la terapia antihipertensiva (ARA's, losartán), en pacientes diabéticos. ECV: enfermedad cardiovascular; IAM: infarto agudo del miocardio; ACVA: accidente cerebro-vascular agudo.

## 1. 5. Regulación de la presión arterial

Los mecanismos que intervienen en el control de la presión arterial (PA) son múltiples y mantienen una estrecha interrelación garantizando la homeostasis del organismo (Fig. 2), estos incluyen (Wyngaarden et al., 1994):

1. El sistema nervioso que actúan rápidamente (segundos) y está compuesto por:

-Barorreceptores.
-Quimiorreceptores.
-Respuesta isquémica del sistema nervioso central (SNC).
-Receptores de baja presión.
Otros mecanismos:
-Participación de los nervios y músculos esqueléticos.
-Ondas respiratorias.

2. Sistemas de regulación de acción intermedia (minutos), donde intervienen:
   -Vasoconstricción del Sistema Renina-Angiotensina.
   -Relajación de los vasos inducida por estrés.
   -Movimiento de los líquidos a través de las paredes de los capilares.
   -Vasoconstrictor noradrenalina, adrenalina.
   -Vasoconstrictor vasopresina.

3. Mecanismo a largo plazo (horas y días), debido a:
   -Control renal: Sistema renal-líquidos corporales.
   -Sistema Renina-Angiostensina-Aldosterona.

Cuando existe un descenso o una elevación de la presión arterial se estimula la acción de los barroreceptores (PA de 60 a 180 mm de Hg), estos se localizan en las paredes de las grandes arterias (la aorta y la carótida) y son sensibles a cambios de presión, aunque responden con mayor eficacia a los aumentos bruscos de PA que a las disminuciones de la misma. El aumento de la PA inhibe el centro vasomotor bulbar y excita el vago, produciendo vasodilatación periférica, la disminución de la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción con la consiguiente disminución de la PA y disminución del gasto cardiaco (GC) (Ganong W. F., 1990). El estímulo de los barorreceptores desencadena un reflejo inmediato que produce una fuerte descarga simpática a todo el organismo, reduciendo al mínimo la presión en el encéfalo y en la parte superior del cuerpo (Fig. 2) (Guyton A. C. and Hall J. E., 2006)

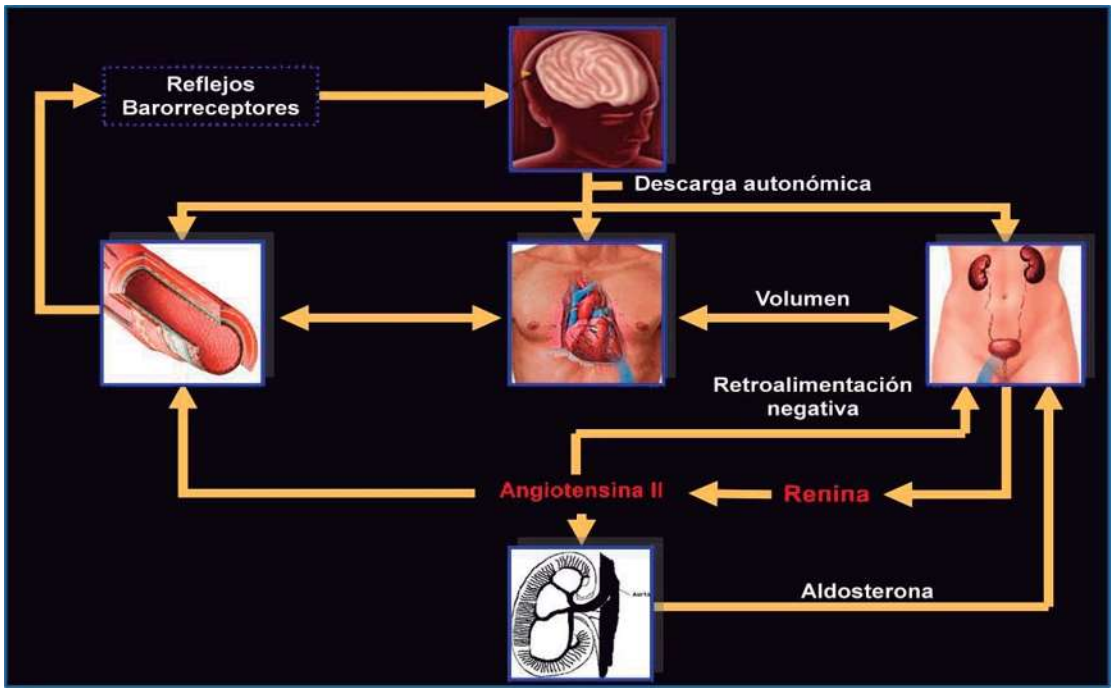



**Fig. 2.** Principal circuito en la regulación de la presión arterial. Un descenso de la presión arterial provoca la activación de los reflejos barorreceptores, la cual a su vez estimula la liberación de noradrenalina del SNC mediante una descarga autonómica, la cual ejerce acción en los riñones, el corazón y los vasos sanguíneos, aumentando la PA. Además, en los riñones se desencadena la liberación de renina, parte del SRA que tiene como producto final la producción de ANG II, potente vasoconstrictor, ademas de regular de manera negativa el sistema. (Modificada de Guyton A. C. and Hall J. E., 2006)

Normalmente, la mayor parte del control nervioso de la PA se lleva a cabo por reflejos que se originan en los barorreceptores, los quimiorreceptores y los receptores de baja presión. El SNC estimula la liberación de noradrenalina (descarga autonómica), la cual estimula el sistema vasoconstrictor simpático, vasomotor y otras zonas de la sustancia reticular del tallo cerebral que transmiten impulsos por los nervios esqueléticos a todos los músculos del cuerpo, produciendo un aumento del tono muscular que conlleva la compresión de los reservorios venosos que

desplazan la sangre al corazón con aumento del GC y de la PA (Ganong W. F., 1990; Guyton A. C. and Hall J. E., 2006)

Además del control nervioso de la PA existen sistemas humorales que participan en la regulación de ésta como el SRA, que es un elemento importante de los mecanismos interrelacionados que regulan la hemodinámica y el equilibrio de agua y electrolitos (Jackson and Garrison, 1996). Los factores que activan el SRA incluyen: la disminución del volumen sanguíneo, la presión de perfusión renal y la concentración de sodio en el plasma. El mediador más importante del SRA es la angiotensina II (Ang II) y el factor limitante en la formación de esta hormona es la producción de renina cuya fuente principal es el riñón. La renina es una enzima proteolítica sintetizada, almacenada y secretada a la circulación arterial renal por las células yuxtaglomerulares que se encuentran en las paredes de la arteriola aferente en la entrada del glomérulo (Cruz-Merida, et al., 2004). La Ang II tiene como funciones principales aumentar la actividad simpática, la reabsorción de sodio y cloruro, retención de potasio y la subsecuente retención de agua. Además, en la corteza adrenal estimula la producción de aldosterona que, a su vez, en el riñón ayuda a la retención-excreción de iones (principalmente $Na^+$) y agua. Sin embargo, su principal función es la vasoconstricción (Cruz-Merida, et al., 2004).

El SNC juega un papel muy importante en la regulación de la presión, pero en estudios recientes (Figueros-Guillén et al., 2009), se ha eliminado la influencia del SNC (modelo de rata descerebrada y desmedulada) con el propósito de analizar la respuesta presora periférica donde participan otros sistemas importantes en la

regulación de la presión arterial como el SRA. La respuesta presora periférica efecto de presión que ejerce la sangre sobre la pared del vaso la cual es dada por la PAD.

## 1. 6. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

El SRA tiene una participación importante en la homeostasis cardiovascular, la regulación de electrolítos y de fluidos, y se ha implicado como un agente causal en el desarrollo de la HA. La renina es una enzima aspartil proteasa producida en las células granulares del aparato yuxtaglomerular renal a partir de un precursor, la pro-renina (Campbell D. J., 2008). Actúa sobre su sustrato el angiotensinógeno, una glucoproteína de 452 aminoácidos de la familia de las alfa-2-globulinas, sintetizado en el hígado y lo transforma en el decapéptido denominado Angiotensina I (Ang I) (Fig.3) (Campbell D. J., 2008).

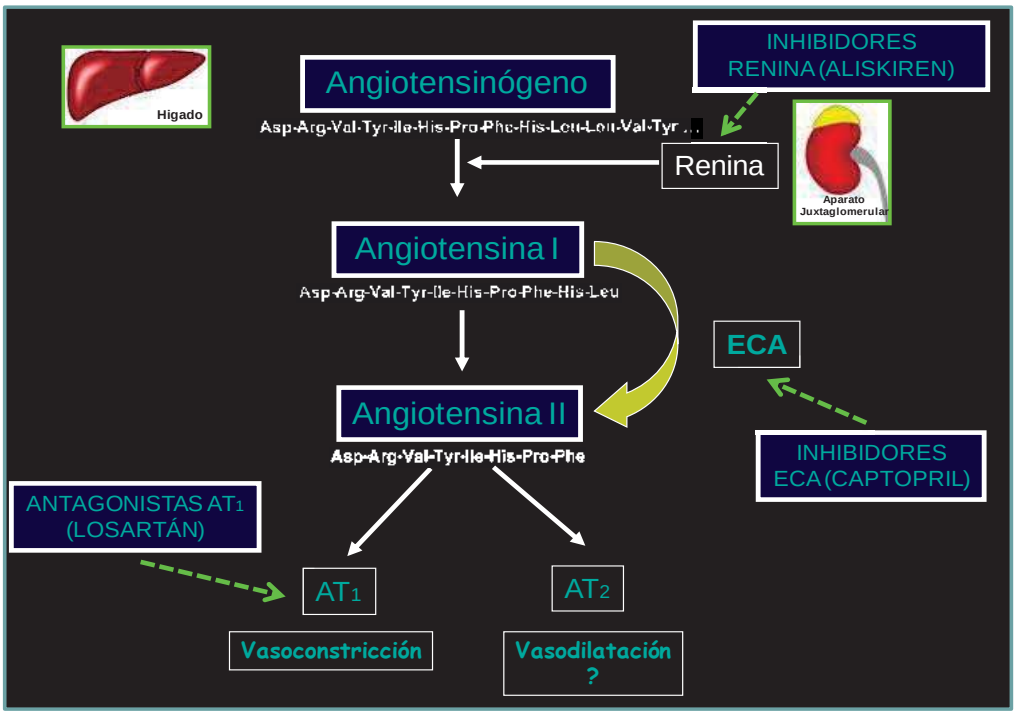



**Fig. 3.** Sistema Renina-Angiotensina clásico: El angiotensinógeno liberado del hígado, es degradado a ANG I (decapéptido) mediante la renina (aspartil proteasa), la cual es secretada del aparato yuxtaglomerular. La ANG I es transformada a ANG II (octapéptido) mediante la ECA (enzima

convertidora de angiotensina), La ANG II media sus efectos mediante dos tipos de receptores ($AT_1$ y $AT_2$), siendo su acción principal la vasoconstricción mediante el receptor $AT_1$. (Tomado de Carey R. M. and Siragi H. M., 2003)

La Ang I es transformada en Ang II, un octapéptido, por medio de una enzima dipeptidil-carboxipeptidasa ubicada en la membrana de las células endoteliales, llamada enzima convertidora de angiotensina (ECA). La Ang II es un péptido excitador del SNC con efectos en diferentes focos que incluyen el hipotálamo y el bulbo, la médula espinal, los ganglios simpáticos y las terminaciones nerviosas. Además, la Ang II inhibe la función barorrefleja (Carey R. M. and Siragi H. M., 2003). A nivel central, la Ang II genera efectos sobre la presión arterial. Una vez sintetizada la Ang II, media sus efectos mediante el estímulo de dos tipos de receptores de la membrana plasmática, el $AT_1$ y el $AT_2$ (Fig. 3), ambos receptores pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Touyz R.M. and Schiffrin E.L., 2000), al receptor $AT_1$ se le atribuyen la mayoría de los efectos a la Ang II.

### I. 6. 1. MECANISMO VASOCONSTRICTOR DE LA ANGIOTENSINA II

En general, la contracción del músculo liso vascular está regulada, principalmente, por la activación de receptores a estímulos y de las proteínas contráctiles. En respuesta a estímulos específicos, la concentración intracelular de calcio aumenta y el catión se combina con calmodulina, formando un complejo que activa a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), la cual fosforila a la cadena ligera de la miosina, permitiendo la formación del puente cruzado de actina y

miosina. El $Ca^{+2}$ intracelular aumenta por la liberación desde el retículo sarcoplásmico y por la entrada del catión a la célula a través de los canales de $Ca^{+2}$.

La Ang II, a través de su receptor $AT_1$, estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-difosfato en el músculo liso vascular por la fosforilación de tirosina cinasa, mediante la fosfolipasa C-γ, dando como resultado la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y de diacilglicerol (DAG), que son segundos mensajeros intracelulares. El IP3 activa la liberación de $Ca+^2$ de los almacenes intracelulares a través de los receptores a IP3 (IP3R), mientras que el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) incrementando, por la estimulación de ambas vías, la concentración intracelular de $Ca^{2+}$. El DAG se deriva de la acción de la fosfolipasa C-γ1 pero también de la conversión del ácido fosfatídico producida por la fosfolipasa D. La PKC actúa potenciando a una proteína inhibidora de la fosfatasa de proteína tipo 1 (CPI17) e inhibe directamente la actividad de la fosfatasa de la miosina de cadena ligera (MLCP), a través de la vía RhoA/Rho-cinasa (Kanaide *et al*., 2003). La inhibición de la fosfatasa de la MLCP causa una mayor amplitud de fosforilación de la miosina para una elevación de $Ca^{+2}$, es decir, sensibiliza el miofilamento a la acción del $Ca^{2+}$. La PKC unida al $Ca^{+2}$ promueve la expresión de factores de transcripción tales como c-*fos*, c-*myc* y c-*jun* (Schneider M. D. and Lorell B. H., 2001, Booz G. W., 2004), vinculados con la hipertrofia cardiaca. También se estimula la transcripción del PDGF-A (Factor-A de crecimiento derivado de plaquetas) y del TGFβ (Factor-β de crecimiento transformando). El receptor $AT_1$ también activa la entrada de $Ca^{+2}$ a través de canales membranales.

### 1. 6. 2. EL RECEPTOR $AT_1$

El $AT_1$ es un receptor de la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a las proteínas G (GPCR), que interviene en múltiples rutas de señalización intracelulares que involucran al calcio, a los fosfolípidos, a las cinasas y a las especies reactivas de oxígeno. Los receptores $AT_1$ se encuentran en las glándulas suprarrenales, en el cerebro, en el riñón, en el músculo liso vascular y en el corazón (Risler *et al.*, 1998). De manera interesante, el receptor $AT_1$ se expresa en todos los órganos que participan en la regulación de la presión arterial. En el sistema vascular, la estimulación del receptor $AT_1$ produce vasoconstricción intensa. En el riñón, la activación de éste receptor provoca vasoconstricción y un aumento de la reabsorción tubular de sodio, mientras que en la glandula suprarrenal induce la liberación de aldosterona que, a su vez, promueve la retención de sodio. En el cerebro, los receptores $AT_1$ intervienen en la respuesta vasopresora y en la regulación de la sed, el apetito por la sal y la liberación de vasopresina (Risler *et al.*, 1998).

### 1. 6. 3. El RECEPTOR $AT_2$

Los receptores $AT_2$ se encuentran en grandes cantidades en los tejidos fetales y disminuyen gradualmente después del nacimiento. Los receptores $AT_2$ inhiben el crecimiento celular e inducen apoptosis y participan en la antiproliferación de células endoteliales de las arterias coronarias e inhiben a la neoíntima y la diferenciación celular (Mukoyama et al., 1993).

Henrion et al., (2001) reportaron que la estimulación del receptor $AT_2$ (*in vitro*) induce la producción de óxido nítrico, es decir, puede tener un efecto vasodilatador. En el mismo estudio se muestra que la estimulación del receptor $AT_2$ inhibe el crecimiento y la proliferación del músculo liso vascular y cardiaco, estimula la apoptosis y promueve la síntesis de la matriz extracelular. *In vivo*, la estimulación crónica del receptor $AT_2$ produce hipertrofia cardiaca y fibrosis (Henrion, et al., 2001).

Además de la expresión de receptores $AT_2$ en el periodo embrionario/fetal se ha reportado que estos son sobre expresados en fibroblastos cardiacos ubicados en las zonas con fibrosis en la insuficiencia cardiaca en la rata. Por otro lado, se ha reportado que estos receptores ejercen acción anti-$AT_1$ durante la progresión de la fibrosis, inhibiendo el metabolismo del colágeno y el crecimiento de los fibroblastos durante la remodelación cardiaca. Tanto los receptores de Ang II como los β adrenérgicos comparten mecanismos de regulación hacia abajo (Ohkubo et al., 1997).

### I. 6. 4. EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LA DIABETES MELLITUS Y EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Los agentes que intervienen en el SRA tales como los IECA's y ARA's se han empleado con éxito en el tratamiento de la hipertensión arterial y de otras enfermedades cardiovasculares (Tabla 2-3). Los antagonistas $AT_1$, como el losartán, interfieren con el SRA al bloquear específicamente las acciones de la Ang II

**TABLA 2.** Beneficios del bloqueo del SRA con IECA´s en pacientes con diabetes mellitus (Segura, 2004).

| AUTOR | FÁRMACOS | PACIENTES | RESULTADOS |
|---|---|---|---|
| Lewis [620] | Captopril | Diabéticos tipo 1 con nefropatía | Reducción tasa de progresión de la IRC<br>Reducción mortalidad y morbilidad |
| Lebovitz [671] | Enalapril | Diabéticos tipo 2 con nefropatía | Preservó mejor el descenso de la TFG |
| Ravid [673] | Enalapril | Diabéticos tipo 2 normotensos con microalbuminuria | Reducción del 42% del riesgo de desarrollar nefropatía |

*IRC: Insuficiencia renal crónica; TFG: Tasa de filtrado glomerular; PA: presión arterial.*

mediadas por el receptor $AT_1$ (Griendling et al., 1996; Timmermans et al., 1993; Unger et al., 1996). Por otro lado, los inhibidores de la ECA interfieren con el SRA al inhibir la generación de la Ang II y potenciar los efectos relajantes de la bradicinina, que son dependientes del óxido nítrico, al inhibir su degradación (Linz et al., 1995).

La Ang II generada por el SRA tiene una participación importante en la regulación de la presión arterial sistémica. Se ha reportado que los componentes del SRA, como la actividad de la renina plasmática, la concentración plasmática de angiotensinógeno (Ruiz *et al.*, 1990; Zicha, J. and Kuneš, J., 1999) y la liberación de renina renal están aumentados en ratas espontáneamente hipertensas jóvenes, lo que sugiere que estos componentes del SRA podrían contribuir a la patogénesis de la hipertensión espontánea (Zicha, J. and Kuneš, J., 1999; Henrich W. L. and Levi M., 1991).

El bloqueo del SRA se acompaña de una reducción de los niveles de presión arterial, que contribuye a la reducción del riesgo cardiovascular global en los pacientes con insuficiencia renal y en el retardo de la progresión de la misma. Además, los fármacos que bloquean dicho sistema, los inhibidores de la ECA y los ARA's aportan efectos nefroprotectores independientes de la reducción de los niveles de la presión arterial (Tabla 2-3).

**TABLA 3.** Beneficios del bloqueo del sistema renina angiotensina con ARA´s en pacientes con diabetes mellitus (Segura, 2004).

| AUTOR, Ref | FÁRMACOS | PACIENTES | RESULTADOS |
|---|---|---|---|
| Parving [622] | Irbesartán | Diabéticos tipo 2 con microalbuminuria | Retraso en la progresión de la nefropatía |
| Lewis [635] | Irbesartán Amlodipino | Diabéticos tipo 2 con nefropatía | Reducción del 23% del riesgo de duplicar los niveles de creatinina, requerir diálisis o fallecer |
| Brenner [634] | Losartán | Diabéticos tipo 2 con nefropatía | Retraso en la progresión de la IRC |
| Viberti [659] | Valsartán Amlodipino | Diabéticos tipo 2 con microalbuminuria | Reducción de la excreción urinaria de albúmina |

*IRC: Insuficiencia renal crónica; PA: presión arterial.*

Por lo anterior, el beneficio del bloqueo del SRA en los pacientes con factores de riesgo cardiovascular no sólo está dado por el control de la presión arterial. Cabe resaltar que los IECA's y los ARA's son la mejor intervención demostrada para disminuir los daños producidos por la hipertensión arterial, la arteriosclerosis y la diabetes mellitus en los órganos blanco (Segura J., 2004).

## 1. 7. DEFICIENCIA DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El óxido nítrico (NO) desempeña un papel importante en la fisiología, en la regulación y en el control de procesos tales como la presión arterial y el tono vasomotor, las interacciones entre el endotelio y las plaquetas, la neurotransmisión, el control de la proliferación y la inmunomodulación. La disfunción en la formación del NO y/o un incremento en el metabolismo del mismo desempeñan una participación en la patogénesis de la hipertensión y de otros desordenes cardiovasculares (Török J., 2008). La deficiencia en la formación del óxido nítrico parece ser el común denominador que subyace a la disfunción endotelial en varias formas de hipertensión arterial experimental (Török J., 2008) y en la hipertensión en el humano (Wimalawansa S. J., 2008).

Además, se conoce que la inhibición de la síntesis del NO produce una elevación de la presión arterial e incrementa las resistencias vasculares periféricas que se asocian con cambios posteriores, tanto funcionales como estructurales (Gardiner et al., 1990; Ribeiro et al., 1992; Bernátová et al., 1999).

La administración en ratas adultas, a largo plazo, de los derivados de la L-arginina, principalmente el Nω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), produce disfunción endotelial incrementando la respuesta vascular, la estimulación adrenérgica y la inflamación perivascular (Török J. and Gerová M., 1996; Holécyová et al., 1996; Pecháňová et al., 1999; Hsieh, et al., 2004). En este sentido, el L-NAME provoca una deficiencia crónica de la producción de NO en ratas, es un agente

vasoconstrictor endotelial y, de esta manera produce hipertensión arterial (Figueroa-Guillén *et al*., 2009; Rivera-Jardón *et al*., 2009). Además, se ha sugerido que el SRA y el sistema nervioso simpático (Hsieh et al., 2004) parecen estar involucrados en la hipertensión inducida por L-NAME (Török et al., 2008). Sin embargo, la producción deficiente de NO parece ser el factor responsable principal en la hipertensión inducida por L-NAME.

# II. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus y la hipertensión arterial son padecimientos importantes y son los principales factores de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares. Las enfermedades cardiovasculares son el problema de salud pública más importante en las naciones industrializadas y actualmente, en México, ocupan el primer lugar de las causas de morbilidad y mortalidad del paciente adulto. Se estima que 15 millones de mexicanos padecen hipertensión arterial y más de la mitad de los pacientes lo ignora. Mientras que existen aproximadamente 25 millones de mexicanos diabéticos.

Se ha reportado que las intervenciones farmacológicas al sistema renina angiotensina tienen un efecto protector sobre el aumento de la PA en etapas tempranas de la hipertensión arterial y, en pacientes con diabetes mellitus, previenen de la nefropatía diabética así como de la hipertrofia cardiaca. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a estos fenómenos no se han esclarecido.

Por lo anterior, resulta interesante estudiar los mecanismos que condicionan la elevación de la presión arterial y el establecimiento de la hipertensión concomitante o secundaria a la diabetes mellitus, específicamente, la participación del sistema renina angiotensina en la co-morbilidad de estas patologías.

# III. HIPÓTESIS

La diabetes mellitus y la hipertensión arterial inducen un aumento en la respuesta presora periférica a la angiotensina II.

# IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial en la respuesta presora periférica a la angiotensina II.

# V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial en la respuesta presora periférica a la angiotensina II.

2. Determinar el efecto del captopril sobre la respuesta presora periférica a la angiotensina II en ratas con diabetes mellitus e hipertensión arterial.

3. Determinar la participación del receptor $AT_1$ en la respuesta presora periférica de ratas con diabetes mellitus e hipertensión arterial.

# VI: MATERIALES Y MÉTODOS

### *6. 1. Animales*

Se usaron ratas Wistar macho de 200-250 g. Todos los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética Institucional y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, México), y se aprobaron por el comité institucional de uso y cuidado de animales.

### *6. 2. Grupos experimentales*

Antes del inicio de los tratamientos las ratas se dividieron en 8 grupos: (1) Control (agua de beber), (2) Captopril (20 mg/kg/día en el agua de beber), (3) Hipertenso (L-NAME 50 mg/kg/día en el agua de beber), (4) Hipertenso + Captopril, (5) Diabético (Estreptozotocina 55 mg/Kg i.p. única dosis 48 h antes del inicio del tratamiento), (6) Diabético + Captopril, (7) Hipertenso + Diabético. (8) Hipertenso + Diabético + Captopril. Los animales se pesaron y se midio el consumo de agua diariamente para ajustar la dosis de los fármacos.

### *6. 3. Valoración de la presión arterial y la concentración de glucosa*

Para determinar la presión sanguínea en las ratas se utilizó un medidor de presión automático LLE 5007 (LSi, LETICA scientific Instruments). Las ratas se colocaron en inmovilizadores de acrílico, dejando libre la cola para colocarles un

manómetro, posteriormente, se introdujeron a un ambientador y registrador LE 565016, a una temperatura de 37 °C para que se dilataran los vasos y poder registrar la presión. Los valores fueron determinados con el software Chart 4 para Windows®. Se consideraron ratas hipertensas aquellas con valores superiores a 140 mm de Hg.

En cuanto a la concentración de glucosa se utilizó un glucómetro y se consideraron como ratas diabéticas las que presentaron valores superiores a 200 mg/dL.

### *6. 4. Preparación del modelo de rata descerebrada y desmedulada*

Las ratas se anestesiaron con éter etílico utilizando una cámara de exposición y una campana de extracción, posteriormente, se realizó una traqueotomía con el objetivo de dar respiración asistida, empleando una bomba de respiración (Hugo Basile®; con 2cc/100g de peso del animal) y se prosiguió a descerebrar y desmedular las ratas con ayuda de un estilete metálico, introduciéndolo por la aurícula del ojo para llegar a cerebro; y después se localizó el agujero magno, donde se introdujo el estilete para destruir la médula espinal y, de esta manera, eliminar la influencia del sistema nervioso central.

Posteriormente, se canuló la arteria carótida izquierda para medir la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca con ayuda de un transductor de presión (Grass) acoplado a un sistema de adquisición de datos (Biopac), mientras que la carótida

derecha se cerró y se canuló la vena femoral derecha para la inyección de los fármacos.

### *6. 5. Respuestas presoras a la angiotensina II*

Con el propósito de determinar el efecto presor vascular, se realizaron curvas dosis-respuesta a la angiotensina II ($1x10^{-6}$ - $3.2x10^{-2}$ mg/Kg) en el modelo de rata descerebrada y desmedulada, en ausencia y presencia de losartán (1 y 3 mg/ml/Kg) para antagonizar a los receptores a la angiotensina $AT_1$ (una curva por animal). En este modelo se puede medir la resistencia de la vasculatura sin la influencia del sistema nervioso central.

Los resultados fueron registrados con el programa AcqKnowledge 3.9.0 donde se registró la presión arterial diastólica, la frecuencia cardiaca. La PAD se empleó debido a que ésta es el mejor indicador de las resistencias vasculares periféricas y los incrementos observados en la PAD fueron graficados.

### *6. 6. Análisis estadístico*

Los resultados se expresaron gráficamente como el promedio ± el error estándar (Sigma Plot 8.02). Posteriormente, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de 2 vías para la comparación entre grupos mediante el programa Sigma Stat 3.0 (Advisory Statistical Software). Además, se calculó el efecto máximo ($E_{max}$) y la concentración efectiva 50 ($CE_{50}$) utilizando regresiones no lineales con parámetros farmacodinámicos empleando el programa WinNonlin™ profesional versión 2.1.

En cuanto a los resultados de los concentración de glucosa y presión arterial sistólica, por tratarse de variables con distribución normal y ser de tipo continuo, se utilizó un ANOVA de una vía. Para todos los resultados obtenidos se tomó como nivel de significancia estadística un valor de $p<0.05$.

# VII. RESULTADOS

### *7. 1. Concentraciones de Glucosa sanguínea*

Para la validación de la presencia de diabetes mellitus en los animales a los que se inyectó estreptozotocina, se realizaron mediciones de los valores de glucosa. Los valores de glucosa se mantuvieron en los límites normales en el grupo de animales que no recibieron estreptozotocina. Contrariamente, en los grupos de animales que recibieron estreptozotocina (grupos DM, DM/captopril, DM/HA y DM/HA/captopril) los valores de glucosa fueron superiores a 400mg/dL, desde las 48 horas posteriores a la inyección de la estreptozotocina y se mantuvieron así hasta el final de los diversos tratamientos (Fig.4). Lo anterior muestra que los como grupos de animales considerados como diabéticos realmente tuvieron hiperglicemia. Por otro lado, podemos observar que los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de glucosa (Fig.4).

### *7. 2. Presión Arterial*

Se midió la presión arterial a los animales de todos los grupos experimentales mediante un método no invasivo (pletismográfico) en la arteria caudal de la rata 48 h antes del inicio del tratamiento, el día del inicio del tratamiento, a los 8 y a los 15 días después del inicio del tratamiento.

En los animales de los grupos que no recibieron captopril podemos observar que, no se presentó ningún cambio en las dos primeras mediciones (valores de PAS

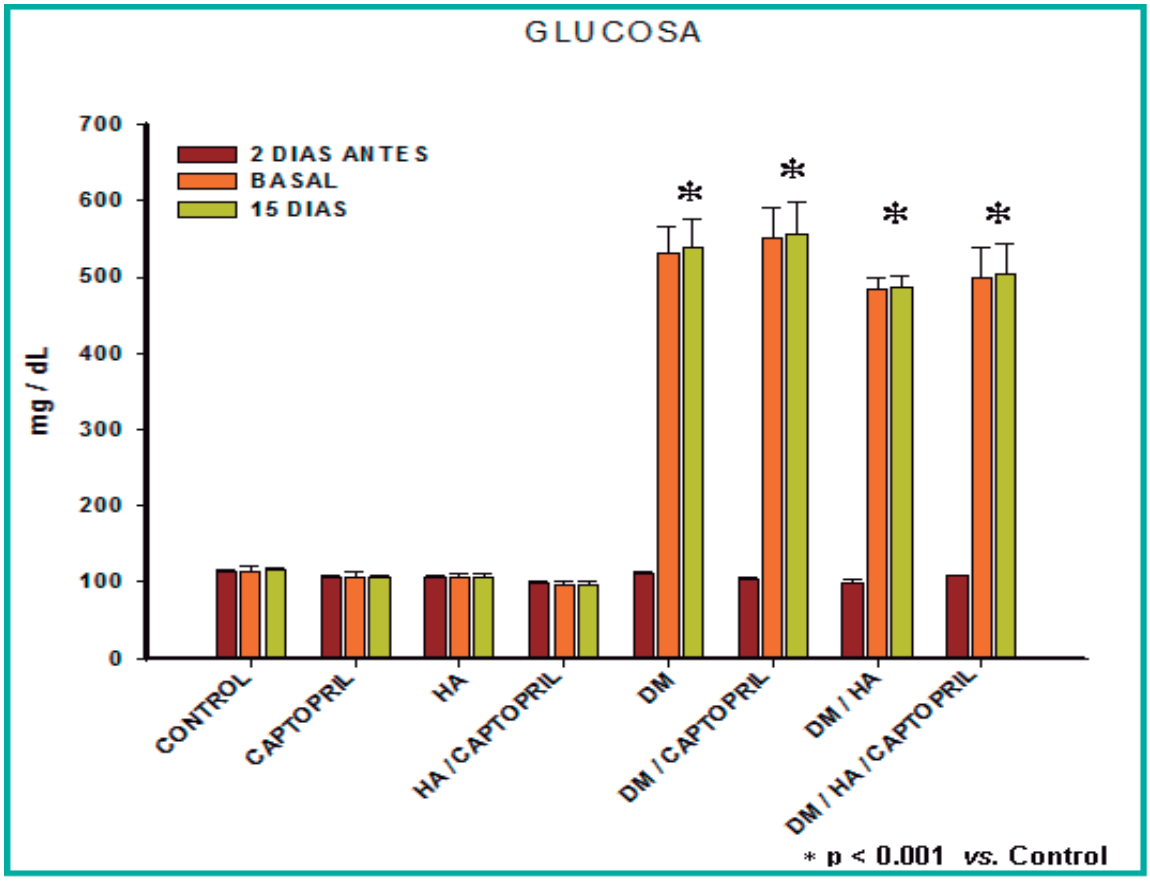



**Fig. 4.** Curso temporal de la concentración de glucosa sanguínea en los grupos control, captopril, HA, HA/captopril, DM, DM/captopril, DM/HA y DM/HA/captopril. La DM se indujo con estreptozotocina (60mg/Kg i.p.; dosis única). n=6

de alrededor de 110 mm Hg), sin embargo, a los 8 días se observó un aumento estadísticamente significativo ($p<0.01$) en la PAS el grupo hipertenso (HA) y en el Diabético/hipertenso (DM/HA) (146.1 ± 1.8 mm Hg y 138.2 ± 3.5 mm Hg, respectivamente); a los 15 días se observó un incremento mayor ($p<0.05$) alcanzando valores finales el grupo (HA: 155.1 ± 2.1 mm Hg y DM/HA: 145 ±3 mm Hg) (Fig.5). Con lo anterior podemos apreciar que los animales que fueron considerados como hipertensos presentaron cifras de PAS de hipertensión.

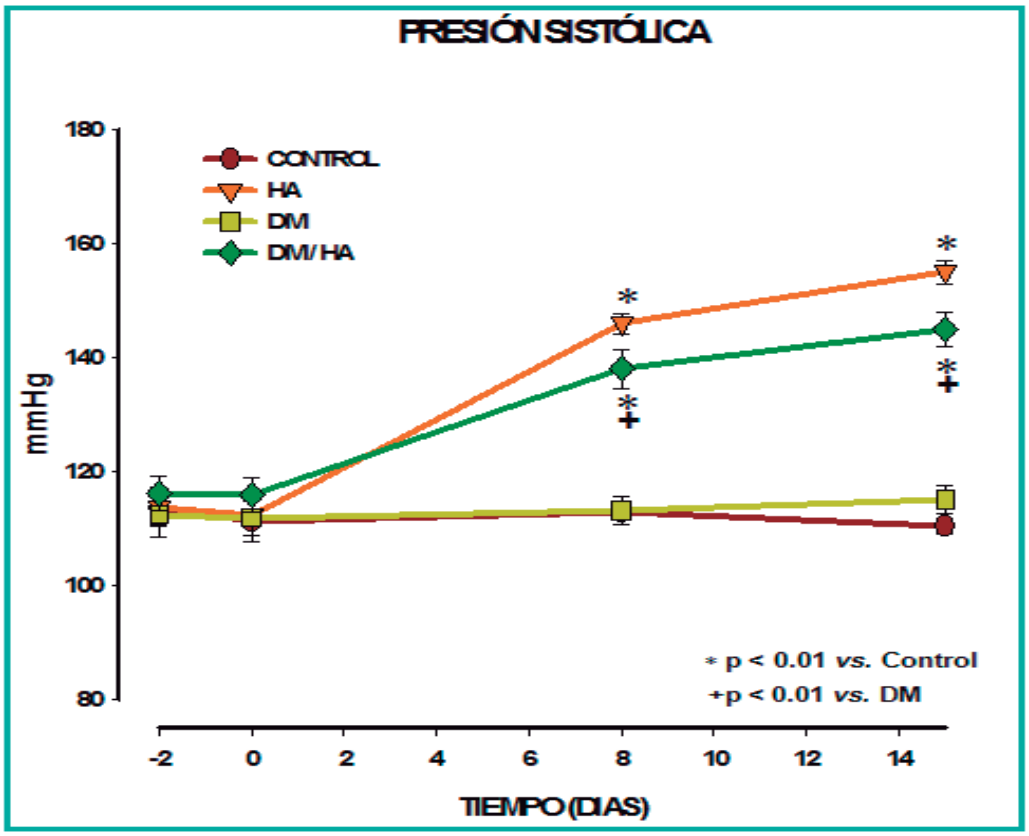



**Fig. 5.** Curso temporal de la presión arterial sistólica. Grupo control (círculos rojos), HA (triángulos naranjas), DM (cuadrados verdes) y DM/HA (rombos verdes). La DM se indujo con estreptozotocina (60mg/Kg i.p.; dosis única). La HA se indujo con L-NAME (75 mg/Kg/día/2 semanas).n=6

### *7. 3. Efecto del captopril sobre la presión arterial*

Para observar el efecto del captopril (antihipertensivo, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) se administró éste en el agua de beber durante 15 días a los distintos grupos. En el grupo control tratado con captopril, se pudo observar que la PAS se mantuvo en los niveles normales hasta los 8 días de tratamiento, sin embargo, a los 15 días de tratamiento se observó una caída de la PAS (96.84 ± 1.26mmHg; $p<0.01$ *vs.* control) (Fig.6). Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de la disminución los valores de PAS, están estos dentro de los valores normales de presión. En los grupos HA/captopril y DM/HA se observó un

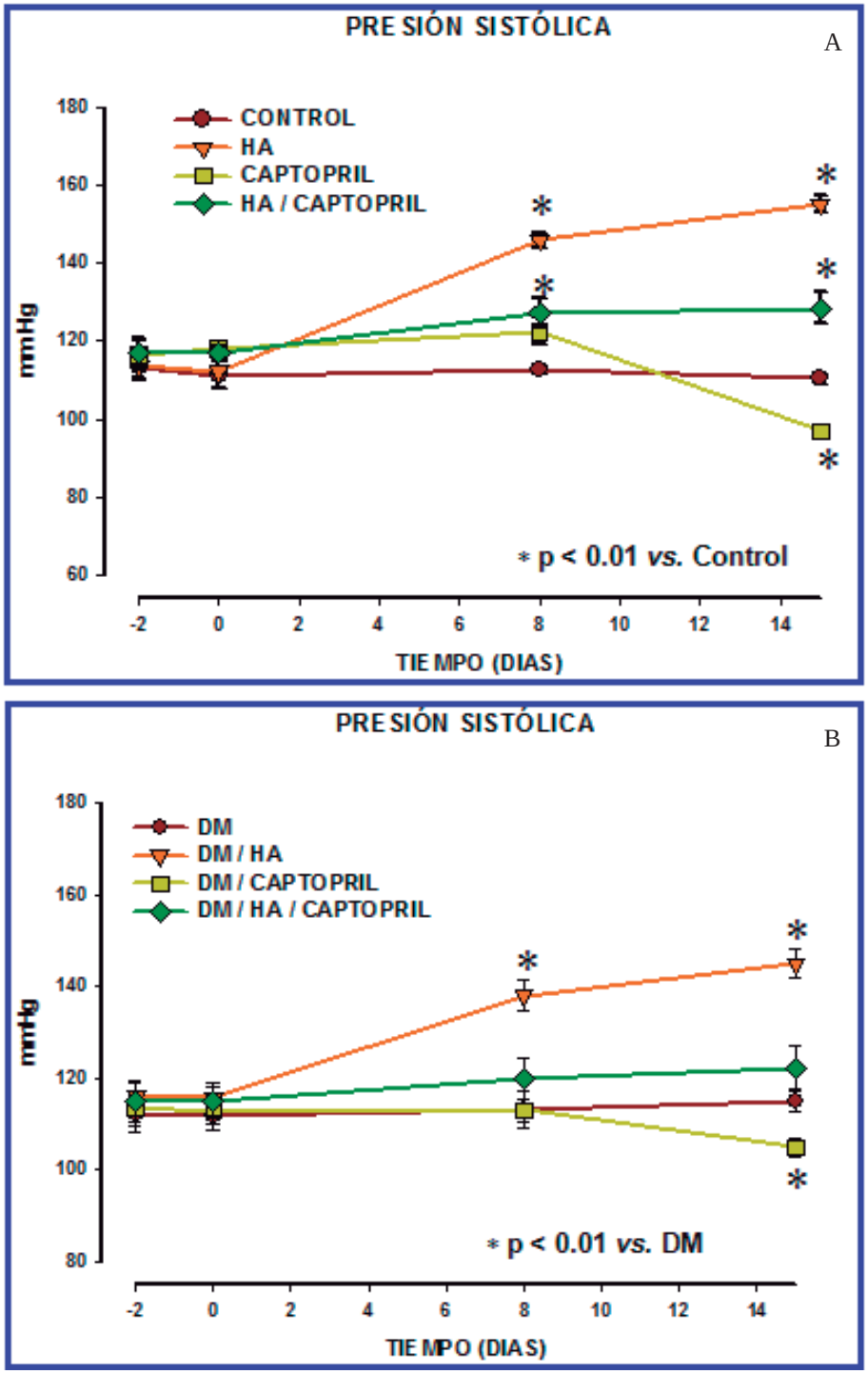



**Fig. 6.** Curso temporal del efecto del captopril sobre la PAS. (A) Grupo control (círculos rojos), HA (triángulos naranjas), Captopril (cuadrados verdes) y HA/Captopril (rombos verdes). (B) DM (círculos rojos), DM/HA (triángulos naranjas), DM/Captopril (cuadrados verdes) y DM/HA/Captopril (rombos verdes). En los grupos con captopril el tratamiento se realizó con 30 mg/Kg/día/2 semanas. n=6

aumento de la PAS, estadísticamente significativo, con respecto al grupo control a los 8 y 15 días del tratamiento y el captopril fue capaz de prevenir este aumento en ambos grupos, manteniendo niveles de PAS de normotensión (Fig. 6).

### *7. 4. Curvas dosis-respuesta a la angiotensina II*

Empleando el modelo de rata descerebrada y desmedulada, se montaron curvas dosis-respuesta a la Ang II. Se observó que la angiotensina II provocó un aumento en la respuesta contráctil periférica, dependiente de la dosis, en animales de todos los grupos hasta alcanzar un efecto máximo ($E_{max}$) (Fig. 7). Además, se pudo observar un desplazamiento de las curvas a la izquierda en el grupo HA, DM y DM/HA que nos indica una mayor sensibilidad a la Ang II en estos grupos(Fig. 7).

La curva del grupo HA presenta además del desplazamiento a la izquierda un incremento en el efecto máximo. Los datos mostrados en la fig. 7 nos sugieren que existe una hipersensibilidad a la Angiotensina II.

### *7. 5. Efecto del captopril sobre la curva dosis-respuesta a la angiotensina II*

En la figura 8 se observa que la angiotensina II produjo un aumento en la respuesta presora, dependiente de la dosis. Además, se aprecia un desplazamiento de las curvas hacia la izquierda con respecto al grupo control, en todos grupos. Los valores de $pD_2$ mostraron que este desplazamiento fue estadísticamente significativo ($p<0.01$), sin observarse otras diferencias entre los grupos ni debidas al tratamiento con captopril (Fig. 8).

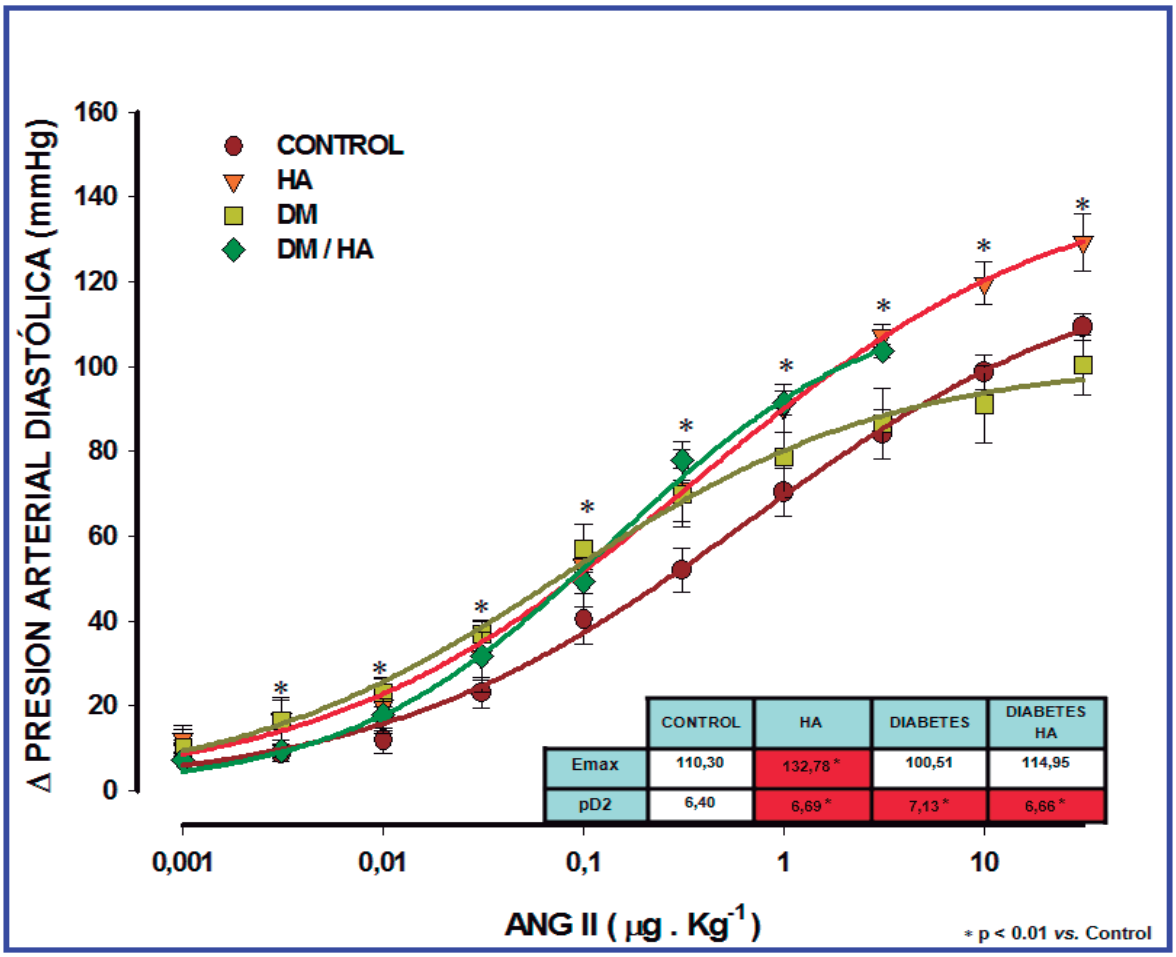



Fig. 7. Curva dosis-respuesta a la Ang II en el modelo de rata descerebrada y desmedulada, en animales de los grupos: control, HA, DM y DM/HA. Cada punto representa el promedio ± el error estándar de 5 – 7 animales. n=6

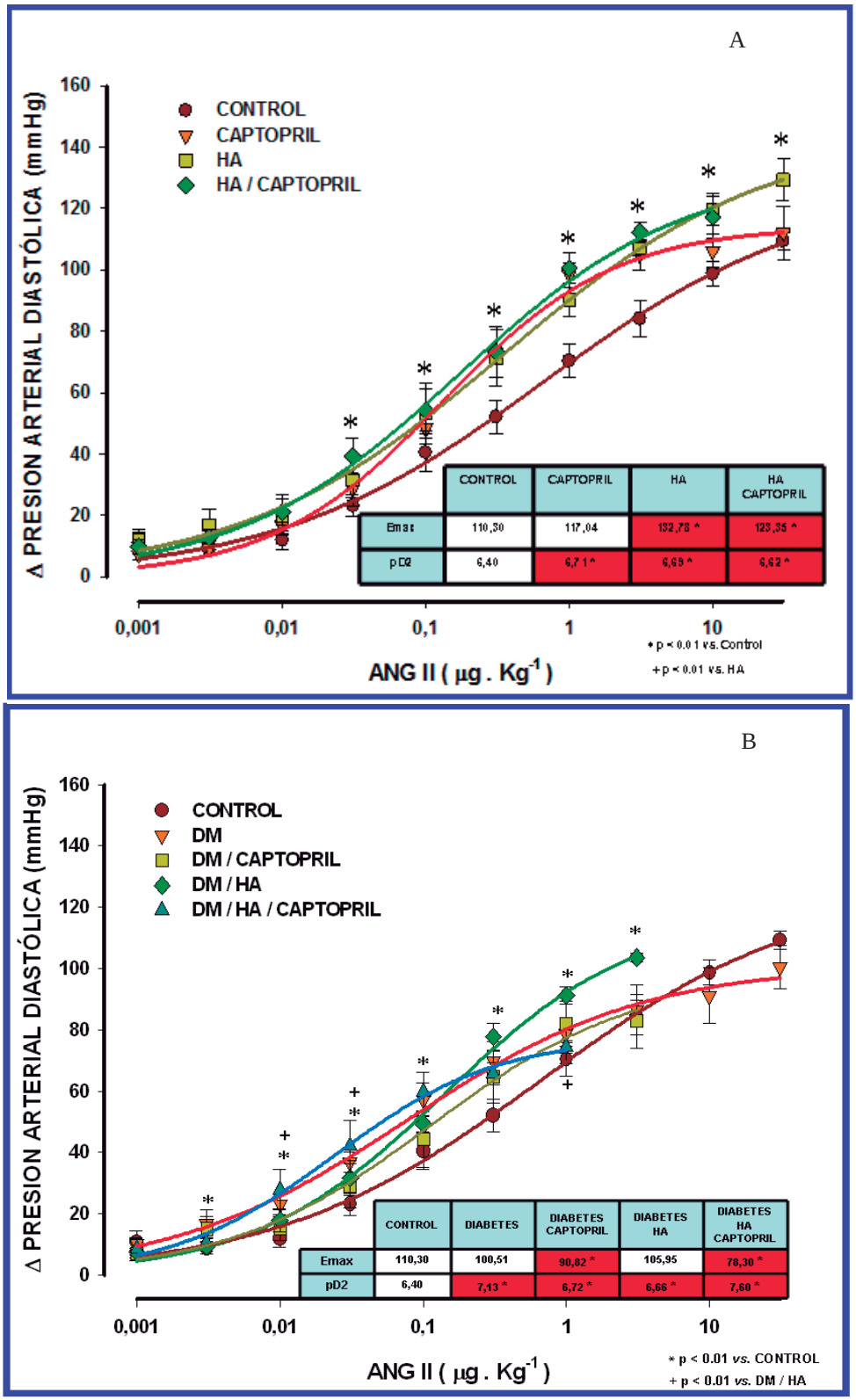


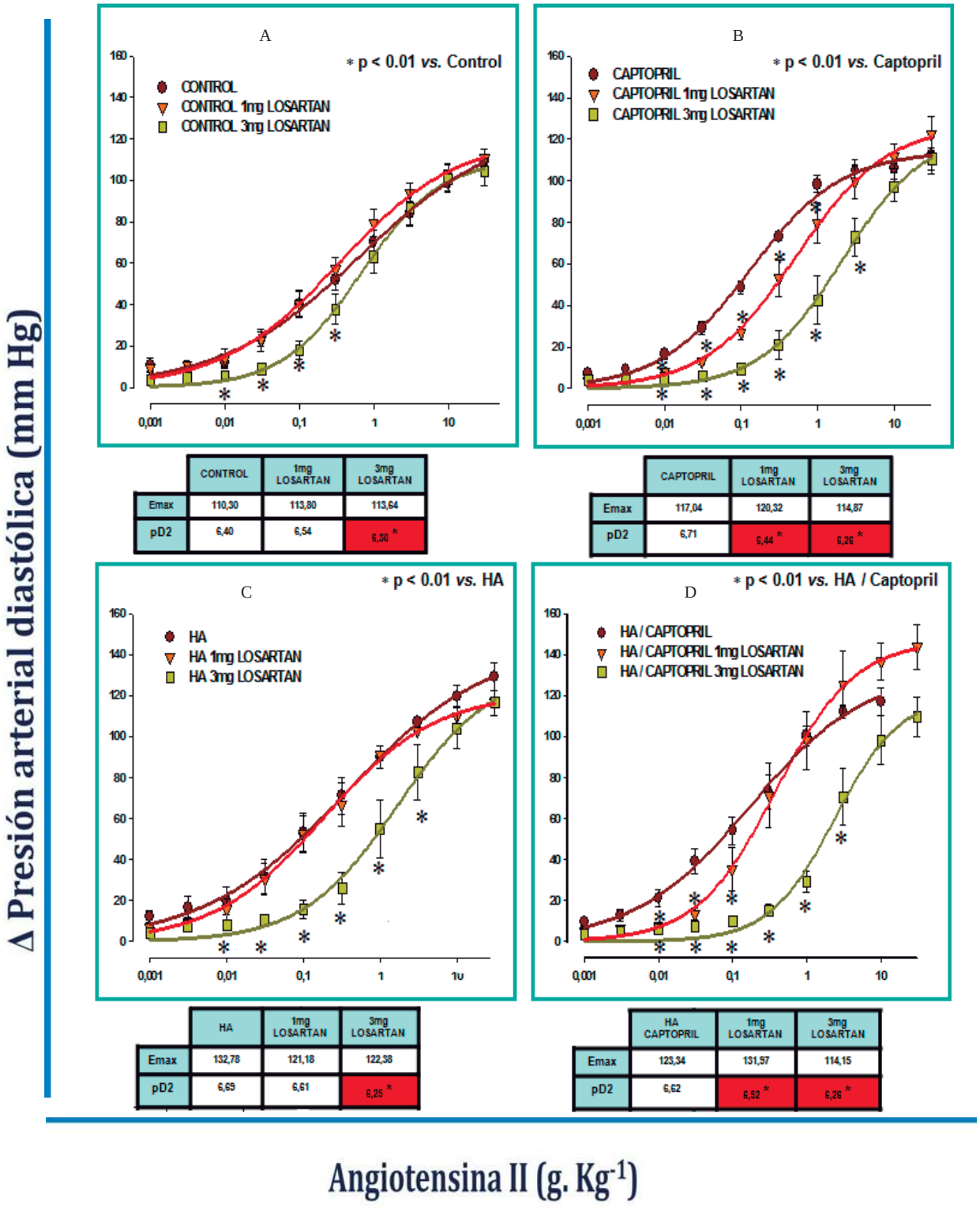

**Fig. 8.** Efecto del captopril sobre las curva dosis-respuesta a la ANG II en rata descerebrada y desmedulada. (A) Grupo control, Grupo HA, Grupo Captopril y Grupo HA/Captopril. (B) Grupo DM. Grupo DM/HA. Grupo DM/Captopril. Grupo DM/HA/Captopril. n=6

### *7. 6. Antagonismo del losartán.*

Se realizaron curvas dosis-respuesta a la Ang II, en presencia de losartán (1-3mg/Kg), un antagonista selectivo del receptor $AT_1$. La figura 9 muestra el antagonismo del losartán, evidenciado como un desplazamiento de las curvas dosis respuesta a la derecha con respecto a sus controles. En el grupo control y el grupo HA (Fig. 9A y 9C, respectivamente) observamos que un 1 mg/Kg de losartán no produjo desplazamiento de la curva, sin embargo, la dosis de 3 mg/Kg produjo un desplazamiento, siendo éste más marcado en el grupo HA (Fig. 9C).

Por otra parte, en los grupos captopril y HA/captopril se observó que hay un desplazamiento de la curva hacia la derecha, dependiente de la dosis de losartán (Fig. 9B y 9D, respectivamente). Estos desplazamientos indican que hay una mayor sensibilidad por el losartán, es decir, que hay una participación mayor del receptor $AT_1$ en la respuesta presora a la Ang II, en estos grupos.

En presencia de la diabetes mellitus, se observó que el losartán produjo un desplazamiento dependiente de la dosis, es decir, a una dosis mayor se registró un desplazamiento mayor (Fig. 10A). De manera interesante, se puede observar que el antagonismo del losartán produjo un bloqueo mayor de la respuesta a la Ang II en los grupos de animales diabéticos (DM, DM/HA, DM/captopril y DM/HA/captopril) con respecto a los no diabéticos (Fig. 9A-D; Fig. 10A-D), indicando que la diabetes mellitus activa al sistema renina angiotensina involucrando una mayor participación del receptor $AT_1$.



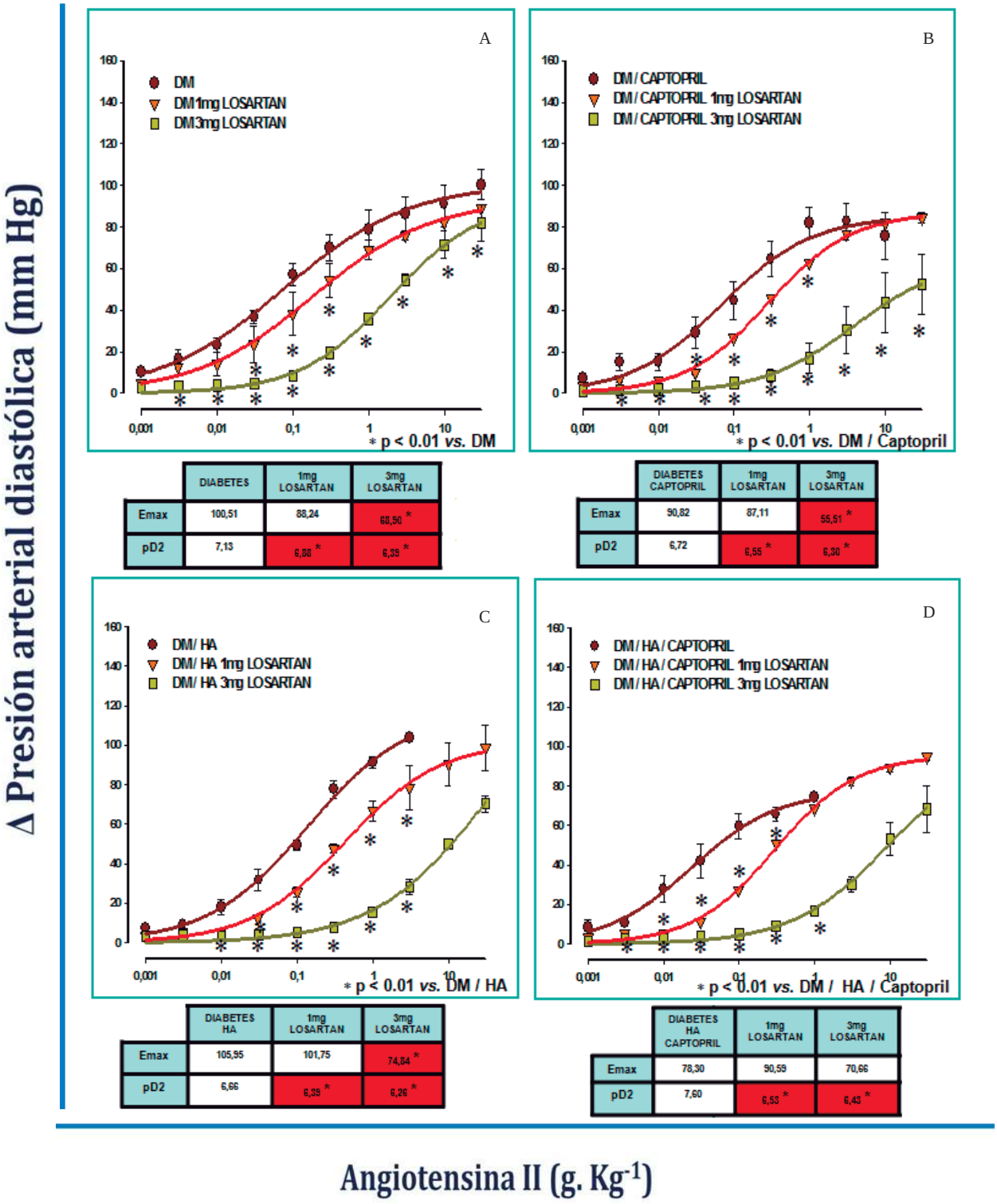

| | CONTROL | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 110,30 | 113,80 | 113,64 |
| pD2 | 6,40 | 6,54 | 6,30 * |

| | CAPTOPRIL | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 117,04 | 120,32 | 114,87 |
| pD2 | 6,71 | 6,44 * | 6,26 * |

| | HA | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 132,78 | 121,18 | 122,38 |
| pD2 | 6,69 | 6,61 | 6,25 * |

| | HA CAPTOPRIL | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 123,34 | 131,97 | 114,15 |
| pD2 | 6,62 | 6,52 * | 6,26 * |

**Fig. 9.** Efecto del losartán, agonista selectivo $AT_1$, sobre la curva dosis-respuesta a la angiotensina II (agonista $AT_1$) en rata descerebrada y desmedulada. (A) Grupo control. (B) Grupo HA. (C) Grupo Captopril. (D) grupo HA/Captopril. n=6




| | DIABETES | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 100,51 | 88,24 | 68,90 * |
| pD2 | 7,13 | 6,88 * | 6,35 * |

| | DIABETES CAPTOPRIL | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 90,82 | 87,11 | 55,51 * |
| pD2 | 6,72 | 6,55 * | 6,30 * |

| | DIABETES HA | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 105,95 | 101,75 | 74,84 * |
| pD2 | 6,66 | 6,35 * | 6,26 * |

| | DIABETES HA CAPTOPRIL | 1mg LOSARTAN | 3mg LOSARTAN |
|---|---|---|---|
| Emax | 78,30 | 90,59 | 70,66 |
| pD2 | 7,60 | 6,53 * | 6,43 * |

**Fig. 10.** Efecto del losartán, agonista selectivo $AT_1$, sobre la curva dosis-respuesta a la angiotensina II (agonista $AT_1$) en rata descerebrada y desmedulada. (A) Grupo DM. (B) Grupo DM/HA. (C) Grupo DM/Captopril. (D) grupo DM/HA/Captopril. n=6

# VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo tratamos de determinar el efecto de la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial en la respuesta presora periférica, esto observando el efecto del captopril sobre la respuesta presora periférica a la angiotensina II en ratas con diabetes mellitus e hipertensión arterial en el modelo de rata descerebrada y desmedulada y la participación del receptor $AT_1$ en estas mismas condiciones

Entre los principales hallazgos de la presente investigación se incluyen:

A nivel funcional, se encontró la presencia de hiperreactividad o hipersensibilidad a la angiotensina II en animales de todos los grupos con respecto al control, el cual fue evidenciado por un aumento en el efecto máximo (grupo HA) y una sensibilidad mayor a la angiotensina II (todos los tratamientos), siendo esta última más marcada en los grupos que presentaron DM.

Además, se encontró que el receptor $AT_1$ participa, de manera importante, en la hiperreactividad a la angiotensina II evidenciada por el efecto del antagonismo con el losartán, observandose el efecto más pronunciado en los grupos que se les administró captopril y a los que se les indujo diabetes mellitus.

## 8. 1. HIPERREACTIVIDAD A LA ANGIOTENSINA II

En el presente estudio (Fig. 5) se demuestra que la inhibición de la síntesis de NO produce hipertensión, de manera aguda, en la rata y que en este tipo de

hipertensión participa el sistema renina angiotensina (Fig. 7), especialmente, mediante una respuesta a la Ang II mayor mediada receptor $AT_1$ (Fig. 9B), a nivel funcional (Rivera-Jardón, *et al*., 2009).

Nuestros resultados (Fig.5) concuerdan con estudios previos reportados en la literatura, en donde se demuestra que el bloqueo crónico con NO produce hipertensión (Bernatova, *et al*., 1999), probablemente debido a la activación de SRA, en este modelo (Qiu *et al*., 1994). Una aportación original (no reportada en la literatura) del presente trabajo es que la hipertensión se produce desde la primera semana de tratamiento (efecto agudo) (Fig.5), es decir, no se necesita de administrar un tratamiento crónico para ver los efectos de la hipertensión y/o estudiar los mecanismos que disparan esta patología.

En este sentido, nuestra propuesta puede resultar ser muy útil en el estudio cronológico de la HA. La gran mayoría de los estudios sobre la HA se realiza cuando la patología ya está establecida y pocos se concentran en el estudio de las causas que la originan. El hecho anterior permite apreciar que los resultados del presente trabajo también pueden servir para explorar los mecanismos involucrados en la génesis de la HA y con el conocimiento de los mismos, permitir el diseño de estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención de esta patología.

La hipersensibilidad a la Ang II observada en las ratas hipertensas inducidas con L-NAME (Fig. 7) se puede explicar, al menos en parte, por un aumento de la expresión del receptor $AT_1$ de la vasculatura y/o en el nivel renal (Fig. 9B). Además, refiriéndose al mismo tema, existente reportes donde la deficiencia en la producción

de NO genera la activación del sistema renina angiotensina, provocando una hiperreactividad a la ANG II en la vasculatura periférica, probablemente atribuida a un aumento en la expresión del receptor $AT_1$ (Figueroa-Guillén *et al*., 2009).

Por otro lado, en cuanto a los grupos diabéticos se observó que la diabetes mellitus induce la activación del sistema renina angiotensina en etapas tempranas de ésta (15 días) , observado por un desplazamiento de la curva hacia la izquierda con respecto al grupo control (Fig. 7 y 8B), lo cual indica un aumento en la hipersensibilidad a la Ang II, debido probablemente a que tanto en los pacientes con diabetes como en la hipertensión, las microvasculatura sufre un severo remodelamiento hipertrófico que puede ser resultado de la hiperactividad del RAS (Levy et al., 2008). Ademas, se ha visto que al inicio de un estado hiperglucémico existe una estimulación del sistema renina angiotensina como respuesta compensatoria a la natriuresis y a la diuresis inducida por la glucosa, siendo ésta activación esencial para prevenir una disminución en la presión arterial (Brands *et al*., 2008).

En los grupos tratados con captopril, se observó una hipersensibilidad inducida por este antihipertensivo. Además, el tratamiento de las ratas con captopril, evitó el desarrollo de la hipertensión (Fig. 6), en algunos reportes se ha sugerido que el captopril previene de la hipertrofia del ventrículo izquierdo en ratas tratadas con L-NAME, sin interferir con la inhibición de las sintasas de NO (Pecháňová et al., 1997, Pecháňová et al., 1999(a)). Estos datos sugieren que el SRA

desempeña una participación importante en el desarrollo de la hipertensión arterial y de la hipertrofia cardiaca.

Además del efecto descrito anteriormente, el captopril produjo hipersensibilidad a la angiotensina II (Fig. 8) en los grupos que recibieron este tratamiento. En algunos estudios se ha comprobado que la Ang II y la ECA desempeñan un importante papel en el engrosamiento de la capa neoíntima de los vasos sanguíneos, es decir, participa en el remodelamiento vascular que se produce cuando hay daño, re-estenosis, HTA, aterosclerosis y formación de aneurisma. Este fenómeno está mediado por el receptor $AT_1$, a través de vías como la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) y la NADPH oxidasa (Heeneman *et al*., 2007). El remodelamiento vascular que conduce a la formación de aneurisma es contrarrestado por la inhibición de la ECA y se estima que están involucradas las métaloproteinasas de la matriz extracelular (Heeneman *et al*., 2007).

Los IECA son capaces de disminuir la resistencia periférica a la insulina, esto se traduce en la clínica en efectos metabólicos favorables (Domínguez *et al*., 1986, Janch *et al*., 1987). Por tanto, el captopril y otros IECA pueden disminuir la resistencia a la insulina, al aumentar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, en particular en el músculo esquelético, tanto en los pacientes hipertensos esenciales como en los diabéticos (Kodama *et al*., 1990). La disminución de la resistencia a la insulina produce una disminución de las necesidades diarias de insulina y mejora el control metabólico (Janch *et al*., 1987)..

Sin embargo, con los datos obtenidos en el presente trabajo no podemos descartar que la hipersensibilidad a la Ang II pueda deberse a cambios en la afinidad de los receptores $AT_1$, a los efectos antimuscarínicos de L-NAME (Buxton *et al*., 1993) y/o a mecanismos post-traduccionales.

Varios estudios han proporcionado evidencia para apoyar la idea de que el receptor $AT_2$ puede tener efectos opuestos a los mediados por el receptor $AT_1$, es decir, se comporta como un antagonista fisiológico de los receptores $AT_1$. Estos hallazgos sugieren que una disminución en la expresión del receptor $AT_2$ puede estar involucrada en la hipertensión, incluso en el modelo de deficiencia de NO, favoreciendo los mecanismos pro-hipertensivos mediados por el receptor $AT_1$.

La deficiencia en la producción de NO parece ser un denominador común que subyace a la disfunción endotelial en las diversas formas de experimentación (Török *et al*., 2008) y en la hipertensión humana (Wimalawansa *et al*., 2008). Se sabe que la inhibición de las sintasas de NO produce la elevación de la presión arterial y el aumento de las resistencias vasculares periféricas que se asocia con cambios tanto funcionales como estructurales posteriores (Gardiner *et al*. 1990, Ribeiro *et al*., 1992 y Bernátová *et al*., 1999).

Se ha reportado que la formación deficiente de óxido nítrico parece ser el principal factor responsable del desarrollo de la hipertensión inducida por L-NAME. Esta idea es apoyada también por el hecho de que este tipo de hipertensión se puede prevenir con la administración de donadores de óxido nítrico (Török J., 2008). Con la información anterior y con base en nuestros resultados sugerimos que

la hipersensibilidad de Ang II en la hipertensión inducida por L-NAME puede deberse a la deficiencia en la producción de NO y a otros mecanismos pro-hipertensivos entre los que se encuentra una hiperactividad del SRA.

## 8. 2. EFECTO DEL LOSARTÁN SOBRE LA REPUESTA A LA ANGIOTENSINA II

Los resultados obtenidos del bloqueo del sistema renina angiotensina con losartán (antagonista selectivo del receptor $AT_1$), mostraron que este antagonizó la respuesta presora periférica a la Ang II (Fig. 9A-D; Fig.10 A-D). Estos resultados sugieren que la hiperreactividad o hipersensibilidad a la angiotensina II, mostrada en los animales de todos los grupos, está mediada por el receptor $AT_1$. Aunque no podemos descartar que existan otros mecanismos involucrados en este fenómeno, tales como un aumento en la afinidad del receptor AT1 por la Ang II, una mayor eficiencia en la transducción de señales y/o una menor expresión del receptor AT2.

El comportamiento diferente de los animales de los grupos, en respuesta al antagonismo de losartán, mostró que los grupos tratados con captopril fueron más sensibles al desplazamiento de las curvas a la derecha con losartán. Este dato sugiere que al inhibir la síntesis de Ang II (con captopril), la ausencia y/o disminución en las concentraciones plasmáticas puede favorecer una regulación a la alta de los receptores $AT_1$, de tal suerte que cuando se realizaron las evaluaciones, la vasculatura de los animales estaba hiperreactiva a la Ang II. Si esta posibilidad es cierta debería de observarse una sobreexpresión de los receptores $AT_1$ en los diversos lechos vasculares.

Se conoce que el bloqueo del SRA disminuye la resistencia a la insulina. Algunos estudios clínicos mostraron una reducción en el inicio de la DM 2 en pacientes tratados con IECA's o ARA's (Schmieder *et al*., 2007).. En este sentido, se ha reportado la acción preventiva asociada al desarrollo de DM de valsartán (un ARA) confrontado con la amlodipina (un antihipertensivo; bloqueador de canales de calcio). En los pacientes hipertensos con riesgo de desarrollar DM 2, los IECA's y los ARA's deberían ser los tratamientos de primera línea, seguidos de los bloqueadores de canales de calcio, por los efectos protectores que confiere el tratamiento (Schmieder *et al*., 2007).

Las complicaciones de la DM 2 también disminuyen, ya que el bloqueo del SRA reduce los valores de microalbuminuria y de proteinuria en los pacientes diabéticos. Ruggenenti et al.,(2004) observaron que el trandolapril (un IECA) previno del inicio de la microalbuminuria. Además del efecto renoprotector, tanto los IECA's como los ARA's disminuyen las complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos.

La efectividad de los IECA's y de los ARA's es similar para los estadios iniciales de la nefropatía diabética pero los ARA's presentan ventajas en los estadios avanzados de la misma (Segura, 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que en la hipersensibilidad mostrada a la Ang II en la hipertensión arterial, en la diabetes mellitus y en la concomitancia de ambas patologías se involucra al receptor $AT_1$ (Fig. 9A-D; Fig.10 A-D) . Por otro lado, el tratamiento con captopril favorece la hiperreactividad a la

Ang II (Fig. 8), probablemente debido a un aumento en el número receptores $AT_1$ (regulación a la alta). Sin embargo, no podemos descartar que la hipersensibilidad a la Ang II pueda deberse a cambios en la afinidad de los receptores $AT_1$, a los efectos antimuscarínicos de L-NAME y/o a mecanismos post-transduccionales.

# IX. CONCLUSIONES

La diabetes mellitus y la hipertensión arterial inducen un aumento en la respuesta presora periférica a la angiotensina II.

El receptor $AT_1$ se encuentra involucrado en la hipersensibilidad a la angiotensina II observada en todos los grupos experimentales.

# X. BIBLIOGRAFIA

Asociación Americana de Diabetes (ADA). *Diabetes Care*. (2006) vol. 29(l); 1 s4-s42 .

Ampudia-Blasco F. J. and Navarro J. *Enfermedad Cardiovascular en la diabetes mellitus.* Med Clin (2002). 118(8); 306-311.

Arias P. *Páncreas endócrino. In: Best and Taylor*. Bases fisiológicas de la práctica médica. Edit. Médica panamericana; (2003). 13a edicion; 701-32.

Brands MW, Labazi H. *Role of glomerular filtration rate in controlling blood pressure early in diabetes*. J. Hypertension (2008) 52(2);188-94.

Bernátová I., Pecháňová O. and Kristek F. *Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney.* Jpn. J. Pharmacol.( 1999). 81; 99-106.

Booz G. W. *Cardiac angiotensin AT2 receptor. What exactly does it do?.* J. Hypertension (2004). 43;1162-1163.

Buxton I .L .O., Cheek, D. J., Eckman, D. M., Westfall, D. P. Sanders, K. M. and Keef. *Nw-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists.* Circ. Res. (1993). 72; 387-395.

Campbell D. J. *Critical view of prorenin an (pro)renin receptor research*. Hypertension (2008). 51;1259-1264

Carey R. M. and Siragy H. M. *Newly recognized components of the renin–angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation.* Endocr Rev (2003) 24; 261 – 271.

Coca A. *Actual blood pressure control. Are we doing the things right?* J Hypertens. (1998). 16; S45-S51.

Chobanian A. V., Bakris G. L., Black H. R., Cushman W. C., Green L. A., Izzo J. L. Jr., Jones D. W., Materson B. J., Oparil S., Wright J. T. Jr., and Roccella E. J. *Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.* J. Hypertension. (2003). 42; 1206 –1252.

Cruz-Camacho M. *Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México.* Archivos de cardiología de Mexico. (2001). 71; 192-197.

Cruz-Mérida A., León-Hernández F. J. and Hernández-Hernández H. *Regulación normal de la presión arterial sistémica.* Revista Mexicana de Cardiología 15, (2004). 1; 30-41.

Deedwania-Prakash C M. *Hypertension and Diabetes New therapeutic Options.* Arch. Intern. Med. (2000). 160; 1585-1594.

Domínguez J. R, Hurtado A, Robles R. G and Sancho-Rof J. *Effects of converting enzyme inhibitors in hypertensive patients with non insulin-dependant diabetes mellitus.* Postgrad. Med. J. (1986). 62; 66-68.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care. (2000); 23: S4-S19.

Figueroa-Guillén E.S., Castro-Moreno P., Rivera-Jardón F.F., Gallardo-Ortiz I.A., Ibarra-Barajas M. and Godínez-Hernández D. *Angiotensin II Pressor Response in the L-NAME-Induced Hypertensive Pithed Rat:Role of the $AT_1$ receptor.* Proc. West. Pharmacol. Soc. (2009). 52; 54-56.

Ganong W. F. Fisiología Médica. 13ra ed. México: Editorial El Manual Moderno. (1990). Pag. 456, 503-513, 542-543

Gardiner S. M., Compton A. M., Bennett T., Palmer R. M. J. and Moncada S. *Regional haemodynamic changes during oral ingestion of $N^G$-monomethyl-L-arginine or $N^G$-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats.* Br. J. Pharmacol. (1990). 101; 10-12.

Griendling K. K., Lassegue B. and Alexander R. W. *Angiotensin receptors and their therapeutic implications*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (1996). 36; 281-306.

Guyton A. C. and Hall J. E. *Fisiología médica*. 11a ed. Elsevier Saunders Inc.; **2006**. p. 204-227.

Herrera-Pombo J. L., Aguilar-Diosdado M., Hawkins F., Campos M. M., García-Hernández A., Castro E, García-Donel L. G, Serraclara A., Sánchez-Malo C. and Escobar-Jiménez M. D. F. *Is increasing urinary albumin a better marker for micro-vascular than for macro-vascular complication of type 2 diabetes mellitus?.* Nephron Clin Pract. (2005) 101(3); 116-121.

Heeneman S., Sluimer I. J. and Daemen M. J. *Angiotensin converting enzyme and vascular remodeling*. Circ. Res. (2007). 101; 441-454

Henrich W. L. and Levi M. *Ontogeny of renal renin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. Am*. J. Physiol. (1991). 260; F530–F535.

Hsieh N. K., Wang J. Y., Liu J. C., Wang S. D. and Chen H. I. *Nitric oxide inhibition accelerates hypertension and induces perivascular inflammation in rats.* Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. (2004). 31; 212-218.

Henrion D., Kubis N. and Lévy B. I. *Physiological and pathophysiological functions of the AT.2 subtype receptor of angiotensin II. From large arteries to the microcirculation*. J. Hypertension. (2001). 38; 1150-1157.

Holécyová A., Török J., Bernátová I. and Pecháňová O. *Restriction of nitric oxide rather than elevated blood pressure is responsible for alterations of vascular responses in nitric oxide-deficient hypertension*. Physiol Res. (1996). 45; 317-321.

Harano M., Suzuki Y. and Koyama. *Multifactorial insulinresistance and clinical impact in hypertension and cardiovascular diseases. J. Diabetes Complications.* (2002). 16; 19-23.

Jackson E. K. and Garrison J. C. *Renina y angiotensina. Las bases Farmacologicas de la terapéuica.* Goodman & Gilman. (1996). 9a Edición; 785-812.

Janch K. W., Hartl W., Gunther M., Wicklmagr M., Rett K. and Dietze G. *Captopril enhaces insulin responsiveness of forearm muscle tissue in non insulin-dependent diabetes mellitus.* Eur. J. Clin. Invest. (1987). 17; 448-454.

Kodama J., Katayama S., Tsbaka K., Itabashi A., Kawasu S. and Isshi J. *Effect of captopril on glucose concentration. Possible role of augmented post-prandial forearm blood flow.* Diabetes Care. (1990). 13; 1109-1111.

Kanaide H., Ichiki T., Nishimura J. and Hirano K.. *Cellular mechanism of vasoconstriction induced by angiotensin II: it remains to be determined.* Circ. Res. (2003). 93; 1015-1017.

Levis E. J., Hunsicker L. G., Bain R. P. and Rohde R. D. *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group.* N. Engl. J. Med. (1993). 330; 152

Levy B. I., Schiffrin E. L., Mourad J. J., Agostini D., Vicaut E., Safar M. E. and Struijker-Boudier H. A. *Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus.* Circ. Res. (2008). 118; 968-976.

Linz W., Gohlke P., Unger T., Schölkens B. A. *Experimental evidence for effects of ramipril on cardiac and vascular hypertrophy beyond blood pressure reduction.* Arch. Mal. Coeur. (1995) 88; 31-34

Mukoyama M., Nakajima M., Horiuchi M., Sasamura H., Pratt R., Dzau V. *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors.* J. Biol. Chem (1993) 268; 24539–24542.

Ohkubo N., Matsubara H., Nozawa Y., Mori Y., Murasawa S., Kijima K., Maruyama K., Masaki H., Tsutumi Y., Shibazaki Y., Iwasaka T. and Inada M. *Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism.* Circ. Res. (1997). 96; 3954-3962.

Olaiz G., Rojas R., Barquera S., Shamah T., Aguilar C., Cravioto P., López P., Hernández M., Tapia R. and Sepúlveda. *Tomo 2. La salud de los adultos.* J. Encuesta Nacional de Salud 2000. 94-114.

Organización Mundial de la Salud. *Nota informativa: enfermedades cardiovasculares.* Sep. (2009). http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html

Paniagua R, Ramos A, Fabian R, Lagunas J, Amato D. *Chronic kidney disease and dialysis in Mexico.* Perit. Dial. Int. (2007). 27(4):405-409.

Paull J. R. A. and Widdop R. E. *Persistent cardiovascular effects of chonic renin-angiotensin system inhibition following withdrawal in adult spontaneously hypertensive rats.* J Hypertension. (2001). 19; 1393-1402.

Pecháňová O., Bernátová I., Pelouch V. and Šimko F. *Protein remodelling of the heart in NO deficient hypertension: the effect of captopril.* J Mol Cell Cardiol. (1997). 29; 3365-3374.

Pecháňová O., Bernátová I., Šimko F., Bernatova I., Pechanova O. and Simko F. *Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney.* Exp. Physiol. (1999). 84; 1095-1105. (a)

Pecháňová O., Bernátová I., Pelouch V., Babál P. *L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart.* Physiol. Res. (1999).48; 353-362. (b)

Qiu C., Engels K., and Baylis C. *Importance of nitric oxide in the control of renal hemodynamics*. Am. J. Physiol. (1994). 266; 1470–1476.

Ribeiro M. O., Antunes E., De Nucci G., Lovisolo S. M. and Zatz R. *Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension*. J. Hypertension. (1992). 20; 298-303.

Risler N., Miatello R., Montserrat C., Castro C. and Bardi V. *Bases moleculares, genéticas y fisiopatológicas de la hipertensión arterial.* Procardio.(1998). 1er Ciclo, Módulo 2; 19-63.

Rivera-Jardón F. F., Castro-Moreno P., Figueroa-Guillén E. S., Gallardo-Ortiz I. A., Godínez-Hernández D. and Ibarra-Barajas M. *Angiotensin II augments renal vasocontriction via $AT_1$ receptor in L-NAME-induced hypertensive rat.* Proc. West. Pharmacol. Soc. (2009). 52; 47-49.

Ross S. and Macleod M. J. *Hypertension in Diabetes: a perspective from clinical pharmacology.* Br. J. of Diabetes and Vascular Disease. (2003). 3;252-256.

Rother K. I. *Diabetes Treatment — Bridging the Divide. N Engl J Med.* (2007). Vol. 356. n.º 15; 1499-1501

Ruggenenti P., Fassi A., Parvanova Ilieva A., Bruno S., Petrov Iliev I., Brusegan V., Rubis N., Gherardi G., Arnoldi F., Ganeva F., Ene-Iordache B., Gaspari F., Perna A., Bossi A., Trevisan R., Dodesini A. and Remuzzi G. *Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes.* N Engl J Med .(2004). 351; 1941-1951.

Ruiz P., Basso N., Cannata M. A. and Taquini A. *C. Clin. The renin-angiotensin system in different stages of spontaneous hypertension in the rat (S H R).* Exp. Hypertension Theory Pract. (1990). 12; 63–81.

Schmieder R. E., Hilgers K. F., Schlaich M. P. and Schmidt Bernhard M. W. *Renin-angiotensin system and cardiovascular risk.* The Lancet. (2007). 369; 1208 – 1219.

Schneider M. D. and Lorell B. H. *AT2, judgment day: Wich angiotensin receptor is the culprit in cardiac hypertrophy*?. Circ. Res. (2001). 104; 247-48.

Sosa Luna C. A., Astudillo de la Vega H., Sánchez González D. J., Martínez Salas S. G., Valdez Espinosa R., Villalobos Molina R. and Ibarra Barajas M. *Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vascúlatura renal de ratas hipertensas.* Rev. Sanid. Milit. (2005). 59; 32-50.

Sowers J. R., Epstein M. and Frohlich E. D. *Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: An Update.* J. Hypertension. (2001). 37; 1053-1059.

Sowers J. R. *Treatment of hypertension in patients with Diabetes*. Arch. Intern. Med. (2004). 27; 164(17):1850-1857.

Segura J. *Bloqueo del sistema renina angiotensina.* Nefrología. (2004). 24; 101-112.

Shepherd P. R. and Kahn B. B. *Mechanisms of disease: Glucose transporters and insulin action. Implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N Engl J Med, (1999); 341:248-57.

Timmermans P. B., Wong P. C., Chiu A. T., Herblin W. F., Benfield P., Carini D. J., Lee R. J. and Wexler R. R., Saye. *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists.* Pharmacol Rev. (1993).45 ; 205-251.

Török J. and Gerová M. *Vascular responses after long-term inhibition of nitric oxide synthesis in newborn dogs.* Physiol. Res. (1996). 45; 323-328.

Török J. *Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension.* Physiol. Res. (2008). 57; 813-825.

Touyz R.M. and Schiffrin E.L. *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells.* Pharmacology Rev (2000). 52; 639-672.

Unger T., Chung O. and Csikos T. *Angiotensin receptors.* J Hypertension (1996). 14;S95-S103.

Wyngaarden, J. B., Smith LL. H., Bennett, J. C. and Cecil. Tratado de Medicina Interna. 19 ed. Vol.1. México: Interamericana, 1994. P. 290-300.

Wimalawansa S. J. *Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indication.* Expert. Opin. Pharmacother. (2008).9; 1935-1954.

Zenteno J. C. and Kofman A. S. *Aspectos genéticos de la hipertensión.* Revista Médica del Hospital General de México. (2003). 66; 218-223..

Zicha, J. and Kuneš, J. *Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat.* Physiol. Rev. (1999). 79; 1227–1282.

Zierath J. R., Krook A. and Wallberg-Henriksson H. *Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle.* Diabetologia. (2000). 43; 821-835.

# XI. Anexo

Proc. West. Pharmacol. Soc. **52**: 54-56 (2009)

# Angiotensin II Pressor Response in the L-NAME-Induced Hypertensive Pithed Rat: Role of the $AT_1$ Receptor

Edgar Saúl Figueroa-Guillén[1], Patricia Castro-Moreno[2], Felipe Francisco Rivera-Jardón[1], Itzell A Gallardo-Ortiz[2], Maximiliano Ibarra-Barajas[2] and Daniel Godínez-Hernández[*1]

[1]*Laboratorio de Farmacología, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,* [2]*Laboratorio de Farmacología Cardiovascular, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, México.*

*Email: dgodinez@umich.mx*

**Abstract**

The blockade of renin-angiotensin system by pharmacological interventions with angiotensin converting-enzyme (ACE) inhibitors or $AT_1$ receptor antagonists in the juvenile critical age may attenuate or even prevent the development of hypertension. In this work, we determined the Ang II type 1 ($AT_1$) receptor role in L-NAME-induced hypertension in pithed rats. Male Wistar rats (250-300 g) were used. Rats were divided into the following groups: Control (tap water) and $N_\omega$-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 60 mg/kg/day/2 weeks). Dose-response curves to Ang II were constructed in the pithed rat. The results show that Ang II evoked blood pressure increase in pithed rats in a dose-related manner. In L-NAME-treated rats a greater maximal effect was observed, indicating that L-NAME promotes Ang II hypersensitivity. In L-NAME-treated rats, Ang II response was blocked by losartan (1 and 3 mg/kg), a selective $AT_1$ receptor antagonist, indicating that $AT_1$ receptor influence L-NAME hypertensive mechanism. Our results suggest that Ang II hypersensitivity in L-NAME-induced hypertension can be due to increased $AT_1$ receptor expression or sensitivity changes.

## Introduction

High blood pressure (hypertension) is a highly prevalent disorder whose complications (including stroke, heart and kidney diseases) are major public health problems [1].

Angiotensin II (Ang II) generated by the renin–angiotensin system (RAS), plays an important role in the regulation of systemic arterial pressure. It has been reported that components of the RAS such as plasma renin activity, plasma angiotensinogen concentration [2, 3] and renal renin release [3, 4], can be enhanced in young spontaneously hypertensive rats, suggesting that these components of the RAS might contribute to the pathogenesis of spontaneous hypertension.

Nitric oxide (NO) plays important physiological roles in disparate processes, such as regulation of blood pressure and vasomotor tone, platelet-endothelium interactions, neurotransmission, control of cell proliferation and immunomodulation. Dysfunction in the formation of NO and/or enhanced NO metabolism is thought to play a role in the pathogenesis of hypertension and other cardiovascular disorders [5]. Long-term administration of L-arginine derivatives, principally, $N^\omega$-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), in adult rats produces endothelial dysfunction, increased vascular responsiveness to adrenergic stimuli and perivascular inflammation [6-9]. The RAS and the sympathetic nervous system [10] are thought to be involved in L-NAME-induced hypertension [5]. In the present study, we investigated whether $AT_1$ receptors are associated with the increased responses to Ang II in L-NAME-induced hypertensive pithed rats.

## Materials and Methods.

*Animals*. Male Wistar rats (250-300 g) were maintained under standard laboratory conditions with free access to food and water. All animal procedures were carried out in accordance with Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (Ministry of Agriculture, NOM-062-ZOO-1999, Mexico) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Rats were divided into two groups: control and treated rats with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME (60 mg/kg/day/14 days) in the drinking water. Systolic blood pressure was measured weekly by tail cuff plethysmography using a LE 5007 automatic blood pressure recorder (Letica, PanLab, Barcelona Spain).

*Pithed rat preparation*. Rats were anaesthetized (sodium pentobarbital, 35 mg/kg, *i.p.*), the trachea cannulated and the animals pithed and artificially respired with a Harvard pump (53 cycles/min; volume: 20 ml/kg); the vagi were then cut. Catheters were placed in the right femoral vein for drug injection and in the left carotid artery for recording of diastolic blood pressure and heart rate; the cannula placed in the carotid artery was connected to a TDS-104A pressure transducer (Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA). Diastolic blood pressure was recorded by a MP100 value-acquisition system (Biopac), while the animals were maintained at 37°C.

Once the animals had stabilized for at least 15 min, basal diastolic blood pressure was determined. After collection of these data, dose-response curves for Ang II (0.001–32 µg/kg, in half-log increments), were constructed. After a 30

min recovery period, rats from both groups received losartan (1 and 3 mg/kg, *i.v.*); 30 min later, a second dose-response curve to Ang II was obtained.

*Data Analysis and Statistics*. Results are expressed as mean ± S.E.M. Differences were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni test ($p < 0.05$ was considered significant).

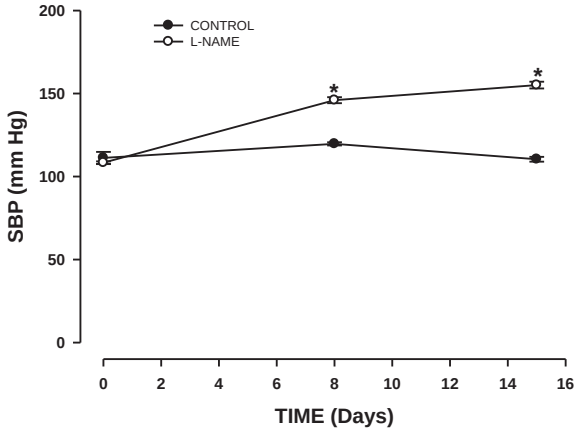



**Figure 1**. Time-course of systolic blood pressure (SBP) on control (filled circles) and L-NAME- induced hypertensive rats (open circles; 60 mg/kg/day/2 weeks). * $p$<0.05 *vs* control.

## Results

After 14 days of treatment, the systolic blood pressure showed a significant increase in the L-NAME group compared with the control group (control: 110.4 ± 1.4 mmHg *vs* L-NAME: 155.2 ± 2.1 mmHg; $p$<0.05; Fig. 1), while L-NAME treatment did not modify heart rate (control: 365 ± 5 BPM *vs* L-NAME 365 ± 6 BPM).

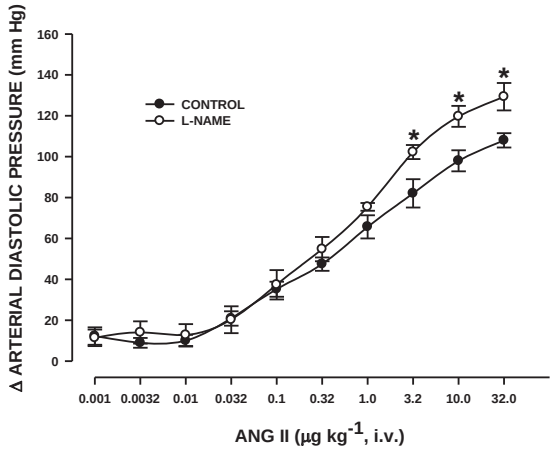



**Figure 2.** Dose-response curves to angiotensin II in control (filled circles) and L-NAME-induced hypertensive rats (open circles; 60 mg/kg/day/2 weeks). * $p$<0.05 *vs* control.

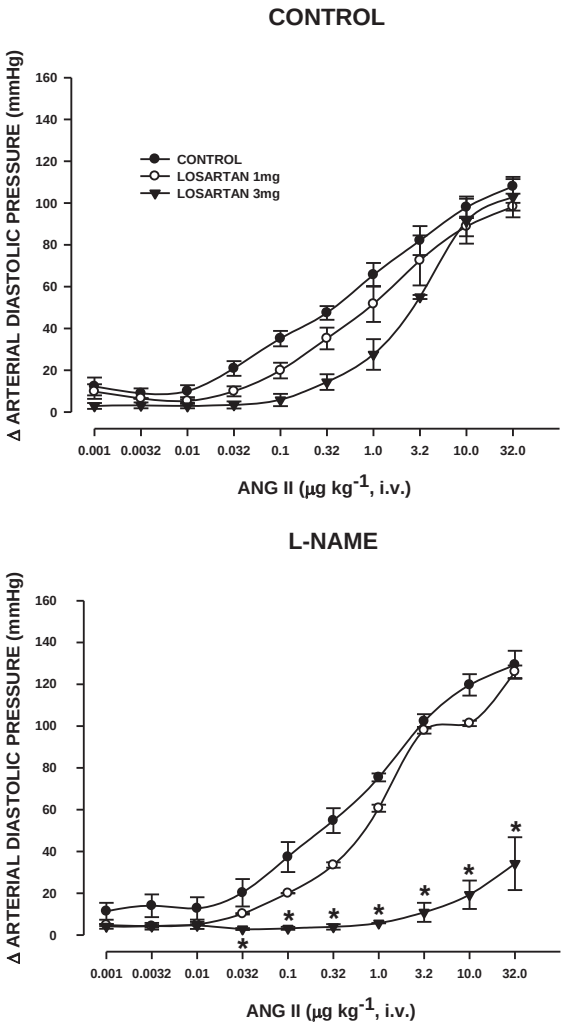



**Figure 3.** Effect of losartan (1 and 3 mg/kg) on dose-response curves to angiotensin II in control (top panel) and L-NAME treated (60 mg/kg/day/14 dqys; symbols as in top panel) hypertensive pithed rats. * $p$<0.05 *vs* control.

ANG II evoked an increase in arterial diastolic pressure in a dose-related manner both in control and L-NAME-treated rats. The vasoconstrictor response to ANG II was slightly greater in L-NAME hypertensive pithed rats than in normotensive pithed rats (Fig 2). Thus, maximal effect was greater in L-NAME-treated rats compared with the control group (control: 107 ± 9 mmHg *vs* L-NAME: 129 ± 7 mmHg; $p$<0.05). In the control group, we observed that the dose–response curves were shifted to the right by losartan (1 and 3 mg/kg), a selective $AT_1$ receptor antagonist, in a dose-dependent manner and the maximal effect was reached (Fig 3). Interestingly, in the L-NAME hypertensive group, losartan only at 3 mg/kg provoked a marked blockade of the Ang II response (Fig 3).

## Discussion

In the present study, we have shown that NO synthesis inhibition produces hypertension acutely in the rat involving the RAS, specifically, an accentuated response to Ang II through $AT_1$ receptor. Our results are in agreement with the studies reported earlier, where it is suggested that chronic NO blockade produces hypertension, probably involving RAS activation, in this model [11]. In addition, treatment of rats with captopril, an ACE inhibitor, prevented the development of hypertension and left ventricle hypertrophy in L-NAME-treated rats, but did not affect NOS inhibition [12,13]. This suggests that RAS plays an important role in the development of hypertension and cardiac hypertrophy. The Ang II hypersensitivity observed in L-NAME-treated rats can be explained, at least in part, by an increased $AT_1$ receptor expression in the vasculature and/or at the renal level. However, with the evidence generated in the present work, we cannot discard that Ang II hypersensitivity can be due to $AT_1$ receptor affinity changes, antimuscarinic effects of L-NAME [14] and/or post-transductional mechanisms.

Several studies have provided evidence to support the notion that the $AT_2$ receptor may have opposing effects to those mediated by the $AT_1$ receptor. Those findings suggest that a decreased $AT_2$ expression could be involved in L-NAME pro-hypertensive mechanisms. NO deficiency seems to be a common denominator underlying endothelial dysfunction in various forms of experimental [5] and human hypertension [15]. It is known that NOS inhibition produces elevation in arterial blood pressure and increased peripheral vascular resistance that is associated with further functional and structural changes [16-18]. Therefore, deficient NO formation seems to be the principal factor responsible for the development of L-NAME-induced hypertension. Such an idea is also supported by the fact that this type of hypertension can be prevented by NO donor administration [5]. Our results suggest that Ang II hypersensitivity in L-NAME-induced hypertension is due to increased $AT_1$ receptors.

**Acknowledgments**

This work was supported by grants IN223009 (MIB) from PAPIIT, DGAPA, UNAM; PAPCA 2008 (MIB) from FES-IZTACALA, UNAM, Mexico; CIC-UMSNH-2008, COECyT-FIFOECyT-2008 and PROMEP PTC-156, UMSNH. E.S.F.G., P.C.M. and F.F.R.J. are graduate fellows of CONACyT, Mexico.

**References**

1. Chobanian A.V., Bakris G.L., Black H.R., Cushman W.C., Green L.A., Izzo J.L. Jr., Jones D.W., Materson B.J., Oparil S., Wright J.T. Jr., Roccella E.J. (2003) *Hypertension* 42, 1206 –1252.
2. Ruiz, P., Basso, N., Cannata, M.A. and Taquini, A.C. (1990) *Clin. Exp. Hypertension Theory Pract.* 12, 63–81.
3. Zicha, J. and Kuneš, J. (1999) *Physiol. Rev.* 79, 1227–1282.
4. Henrich, W.L. and Levi, M. (1991*) Am. J. Physiol.* 260, F530–F535.
5. Török J. (2008) *Physiol. Res.* 57, 813-825.
6. Török J., Gerová M. (1996) *Physiol Res.* 45, 323-328.
7. Holécyová A., Török J., Bernátová I., Pecháňová O. (1996) *Physiol Res.* 45, 317-321.
8. Pecháňová O., Bernátová I., Pelouch V., Babál P. (1999) *Physiol Res.* 48, 353-362.
9. Hsieh N.K., Wang J.Y., Liu J.C., Wang S.D., Chen H.I. (2004) *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 212-218.
10. Patel K.P., Li Y.F., Hirooka Y. *Exp Biol Med* 226, 814-824.
11. Qiu, C., Engels, K., and Baylis, C. (1994) *Am. J. Physiol.* 266, R1470–R1476.
12. Pecháňová O., Bernátová I., Pelouch V., Šimko F. (1997) *J Mol Cell Cardiol* 29, 3365-3374.
13. Pecháňová O., Bernátová I., Šimko F. (1999) *Exp Physiol* 84, 1095-1105.
14. Buxton, I.L.O., Cheek, D.J., Eckman, D.M., Westfall, D.P. Sanders, K.M. and Keef, K.D. (1993) Circulation Research 72: 387-395
15. Wimalawansa S.J. (2008) *Expert Opin Pharmacother*. 9(11),1935-54.
16. Gardiner S.M., Compton A.M., Bennett T., Palmer R.M.J., Moncada S. (1990) *Br J Pharmacol* 101: 10-12.
17. Ribeiro M.O., Antunes E., De Nucci G., Lovisolo S.M., Zatz R. (1992) *Hypertension* 20: 298-303.
18. Bernátová I., Pecháňová O., Kristek F. (1999) *Jpn J Pharmacol* 81, 99-106.