



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“RESPUESTAS A LA BRADICININA Y A LA FENILEFRINA
EN RIÑÓN Y AORTA DE RATAS HIPERTENSAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. XÓCHITL LETICIA RUIZ PÉREZ

ASESORES:

D.C. DANIEL GODÍNEZ HERNANDEZ

M.C. HÉCTOR URQUIZA MARÍN

Morelia, Michoacán Febrero, 2011



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

ÍNDICE

Resumen	3
1.- Introducción	4
1.1.- Hipertensión	4
a) Definición	4
b) Clasificación	4
1.2.- Modulación de la presión de arterial	5
1.2.1.- Barorreceptores (BRs)	6
1.2.2.- Control humoral	7
a) Agentes vasoconstrictores	7
b) Agentes vasodilatadores	13
1.2.3.- Control renal	18
a) Sistema renina-angiotensina	18
b) Sistema calicreína-cininas	19
2.- El endotelio en la modulación del tono vascular	20
3.- Antecedentes específicos	22
4.- Justificación	26
5.- Hipótesis	27
6.- Objetivo	27
7.- Objetivos específicos	27
8.- Materiales y métodos	28
8.1.- Riñón aislado y perfundido	29
8.2.- Tejido aislado	31
9.- Análisis estadísticos de los resultados	33
10.- Fármacos empleados	33
11.- Resultados	
11.1.- Efecto de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas renales	34
a) Presión de perfusión basal	34
b) Determinación del efecto de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas renales	35
11.2.- Efecto de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas vasculares	
a) Participación del endotelio en la regularización de la contracción	38
b) Efecto de la inhibición de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas	40

12.-	Discusión	43
13.-	Conclusiones	45
14.-	Perspectivas	46
15.-	Referencias	47
16.-	Anexos	53

RESUMEN

La hipertensión es una enfermedad multifactorial e idiopática, es decir; se desconoce el factor que desencadena dicha patología. Se ha descrito que durante esta condición el sistema renina angiotensina se encuentra sobreactivado, presentándose un incremento en la síntesis de angiotensina II. Además, se ha observado un incremento en la población de receptores α_{1D} adrenérgicos antes del desarrollo de la hipertensión. Por otro lado, existe contradicción acerca de la participación de la bradicinina en la regulación de la presión. Por lo anterior, nuestra hipótesis es que la hipertensión promueve un incremento en las respuestas adrenérgicas y una disminución en la vasodilatación mediada por la bradicinina. Para abordar la hipótesis se utilizaron ratas Wistar macho de 4 semanas de edad, y se formaron 4 grupos: ratas control (vehículo), ratas hipertensas (L-NAME), ratas tratadas con captopril (captopril) y ratas hipertensas tratadas (L-NAME+captopril), a las cuales se les administraron los fármacos en el agua de beber a una dosis de 75 y 30mg/kg/día, respectivamente. Se realizaron curvas dosis respuesta a la fenilefrina en riñón y curvas dosis respuesta a la bradicinina en aorta con y sin endotelio y en presencia o ausencia HOE 140 (un antagonista del receptor B_2 a la bradicinina). Los resultados mostraron que la fenilefrina produjo en riñón y en aorta una contracción dependiente de la concentración, también se observó hipersensibilidad en ambos tejidos durante la hipertensión. Se demostró que la bradicinina participa de manera tejido dependiente, en riñón contribuye a la regulación de la presión de perfusión, mientras que en aorta parece no tener participación en la modulación del tono vascular. Además, la vasodilatación mediada por la bradicinina aumentó durante la hipertensión, tanto en riñón como en aorta. En conclusión, la hipertensión promueve un incremento en las respuestas adrenérgicas vasculares y renales. Además, la vasodilatación mediada por la bradicinina se ve incrementada durante la hipertensión.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- HIPERTENSIÓN

a) DEFINICIÓN

La hipertensión arterial (HT) es una enfermedad crónico-degenerativa en la que se presenta un incremento sostenido de la presión arterial con valores de presión iguales o superiores a 140/90 mm de mercurio y cuya principal característica es una disminución en la síntesis de óxido nítrico (Guyton y Hall, 1997). Durante este padecimiento se presenta un incremento en la resistencia vascular periférica causada por alteraciones funcionales y estructurales de las paredes de los vasos de calibre pequeño (Taddei y Salvetti, 1996).

b) CLASIFICACIÓN

La hipertensión puede clasificarse según el nivel de presión sanguínea o dependiendo de la etiología.

❖ *SEGÚN LA PRESIÓN SANGUÍNEA* (Pickering, 1995):

Tabla 1. Clasificación de la presión sanguínea.

Categoría	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)
Normal	<130	<85
Normal alta	130-139	85-89
Hipertensión		
Etapa 1 (ligera)	140-159	90-99
Etapa 2 (moderada)	160-179	100-109
Etapa 3 (severa)	180-209	110-119
Etapa 4 (muy severa)	≥210	≥120

❖ *SEGÚN ETIOLOGÍA:*

HIPERTENSIÓN PRIMARIA O ESENCIAL: Es el incremento en la presión sanguínea sin causa orgánica aparente.

HIPERTENSIÓN SECUNDARIA: En este tipo de hipertensión, el aumento en presión sanguínea se debe a una patología asociada, es decir es de causa identificable. Puede ser debido a un medicamento, complicaciones durante el embarazo, enfermedades renales o cardíacas.

1.2.- MODULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Son múltiples los mecanismos conocidos que intervienen en el control de la presión arterial y que al mantener una estrecha interrelación garantizan la homeostasis del organismo, estos son:

1. Los nerviosos actúan rápidamente (segundos).
 - Barorreceptores.
 - Quimiorreceptores.
 - Respuesta isquémica del SNC.
 - Receptores de baja presión.

2. Sistema de regulación de acción intermedia (minutos).
 - Vasoconstricción del Sistema Renina-Angiotensina.
 - Relajación de los vasos inducidos por stress.
 - 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).
 - Control renal: Sistema renal-Líquidos corporales.
 - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

1.2.1.- BARORRECEPTORES (BRs)

Cuando existe un descenso o elevación de la presión se estimula la acción de los BRs (en un rango de 60 a 180 mmHg), estos se encuentran localizados en las paredes de las grandes arterias: aórticas y carotídeas y son sensibles a cambios de presión, responden con mayor eficacia a los aumentos bruscos de presión arterial (PA) sin que se excluya su funcionamiento en caídas de la misma. El aumento de la PA inhibe el centro vasomotor bulbar y excita el vago, todo esto conlleva a la 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. El estímulo de estos receptores desencadenan un reflejo inmediato que produce una fuerte descarga simpática a todo el organismo, reduciendo al mínimo la presión en la cabeza y parte superior del cuerpo (Fig. 1). Durante la hipertensión, los BRs presentan el fenómeno de reajuste o reubicación, por lo cual el umbral de su activación se torna más alto. Aunque todavía son capaces de responder a los ascensos agudos, no son capaces de regularizar la PA a niveles normales. Las anormalidades de los BRs que se presentan en la hipertensión, contribuyen al daño de órganos blanco (Gourine, 2005).

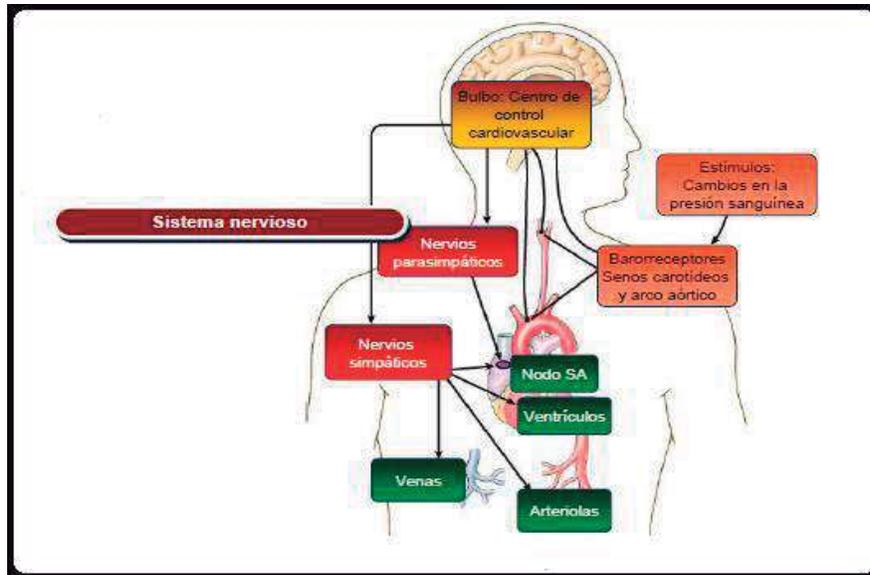


Figura 1. Control nervioso de la presión sanguínea.
Activación del sistema nervioso ante un cambio en presión sanguínea.

1.2.2.- CONTROL HUMORAL

Este tipo de control puede incrementar y disminuir la presión sanguínea, mediante sustancias vasoconstrictoras, vasodilatadoras y regulación del volumen sanguíneo.

a) AGENTES VASOCONSTRICTORES.

NORADRENALINA Y ADRENALINA.

La noradrenalina se comporta como neurotransmisor (en la mayor parte de las fibras simpáticas post-ganglionares y ciertas vías del sistema nervioso central) y la adrenalina como principal hormona liberada de la médula suprarrenal con acción en tejidos periféricos (Lefkowitz et al., 1996). Ambas son agonistas directos de las células efectoras y sus acciones farmacológicas

difieren sobre todo en su eficacia para estimular a los receptores adrenérgicos α y β .

La adrenalina es un estimulante potente de los receptores adrenérgicos tanto α como β por lo que sus efectos en los órganos blanco son complejos. Por otro lado, la noradrenalina es un agonista potente de los receptores α y tiene relativamente poca afinidad por los receptores β_2 , sin embargo, es menos potente que la adrenalina en los receptores α de casi todos los órganos (Hoffman y Lefkowitz, 1996).

Cuando el sistema nervioso simpático está estimulado, las terminaciones nerviosas simpáticas de los tejidos liberan noradrenalina que estimula el corazón, las venas y las arteriolas. Los nervios simpáticos de la médula suprarrenal hacen también que estas glándulas segreguen a la sangre noradrenalina y adrenalina (Guyton y Hall, 1997).

La adrenalina aumenta la presión arterial por tres mecanismos: 1) estimulación miocárdica directa que incrementa la fuerza de contracción ventricular (efecto inotrópico positivo), 2) aumento de la frecuencia cardiaca (efecto cronotrópico positivo) y 3) vasoconstricción arteriolar (sobre todo de los vasos de resistencia de piel, mucosas y riñón) venosa y de los vasos de conducción (Hoffman y Lefkowitz, 1996).

La noradrenalina, incrementa la presiones sistólica y diastólica, se eleva la resistencia periférica total, en parte por la presencia de constricción venosa. La resistencia vascular periférica aumenta en la mayor parte de los lechos vasculares como el mesentérico y se reduce el flujo sanguíneo hacia el riñón, el hígado, el bazo y, casi siempre, el músculo estriado. Además, aumenta de

manera importante el flujo coronario, tal vez como un efecto indirecto (Hoffman y Lefkowitz, 1996).

RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los receptores adrenérgicos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Lefkowitz y Caron, 1988) y se dividen en tres tipos: α_1 , α_2 y β con base en su farmacología, estructura y mecanismos de señalización (Bylund et al., 1994).

RECEPTORES β

Los receptores adrenérgicos β fueron subdivididos en β_1 y β_2 con base en su potencia relativa en respuesta a varias catecolaminas y en β_3 en tejido adiposo. Estos receptores tienen una identidad cercana al 60% en la secuencia de aminoácidos donde se encuentra el sitio de fijación de ligandos para adrenalina y noradrenalina (Strader et al., 1994). Todos los receptores β estimulan la adenilato ciclasa, vía proteína G_s , incrementando los niveles de AMP_c , lo que a su vez puede activar a la cinasa dependiente de AMP_c (Taussing y Gilman, 1995).

Los receptores β_1 predominan en corazón y en tejido adiposo, principalmente producen un incremento en el ritmo y en la fuerza de contracción del corazón. La activación de los receptores β_2 en músculo liso genitourinario, vascular y bronquial produce relajación del útero, vasodilatación y broncodilatación, respectivamente. Los receptores β_3 están involucrados en la

regulación de cambios en el metabolismo energético y termogénesis inducidos por noradrenalina (Veglio et al., 2001).

RECEPTORES α

Se conocen 2 tipos de receptores adrenérgicos α , los α_1 y los α_2 . Los receptores adrenérgicos α_1 actúan por estimulación de una fosfolipasa C, vía proteína G_q , generando inositol trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros producen movilización intracelular de Ca^{2+} (por activación de canales dependientes e independientes de voltaje) y activación de proteína cinasa C (PKC), respectivamente; además, activan fosfolipasa A_2 y D, liberan ácido araquidónico y forman AMP_c (Veglio et al., 2001).

Se han descrito alteraciones en las respuestas adrenérgicas α en diferentes modelos de hipertensión y de tejidos estudiados (Takata y Kato, 1996) y no se conoce si estas alteraciones: 1) contribuyen al desarrollo o el mantenimiento de la hipertensión; 2) se presentan en respuesta al incremento en la presión arterial o 3) no están relacionadas con el aumento de la presión arterial (Marín, 1993; Takata y Kato, 1996). En este sentido, Villalobos-Molina et al. (1999) proponen que el receptor adrenérgico α_{1D} probablemente está relacionado con la génesis y/o el mantenimiento de la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas.

Los receptores α_2 son clasificados en los subtipos α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} (Bylund et al., 1994). Se localizan en neuronas tanto pre-sinápticas como post-sinápticas y juegan un papel inhibitorio en el sistema nervioso central y periférico. En el sistema nervioso central, se encuentran como autorreceptores (al parecer el subtipo α_{2A} ; Aantaa et al, 1995) en las terminales noradrenérgicas donde

regulan la liberación de noradrenalina y como heterorreceptores en otras terminales nerviosas. La estimulación de los receptores α_2 post-sinápticos en el encéfalo produce una reducción de los impulsos simpáticos que salen del sistema nervioso central y parece ser la causa de un componente importante del efecto antihipertensivo de fármacos como la clonidina (Lefkowitz et al., 1996). Además, la estimulación central α_2 produce efectos sedantes, analgésicos, anestésicos, hipotermia, regulación del diámetro pupilar y desempeñan un papel en la función cognitiva. Periféricamente producen contracción del músculo liso vascular, inhibición de la lipólisis e hiperpolarización de los ganglios simpáticos (Veglio et al., 2001).

El principal mecanismo efector de los receptores α_2 es una disminución de los niveles intracelulares del AMP_c que resulta de un acoplamiento negativo con la adenilato ciclasa, vía proteína G_i (Veglio et al., 2001).

ANGIOTENSINA.

La angiotensina II es un octapéptido vasoactivo que se forma a partir de la angiotensina I (decapéptido inactivo) por acción de una dipeptidil carboxipeptidasa conocida con el nombre de enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima se encuentra en varios sitios del organismo incluyendo las células del endotelio vascular que, además, tienen los componentes necesarios para la síntesis de angiotensina II (Erdös, 1975; Shai et al., 1992). La renina es una proteinasa aspártica que se sintetiza en las células de músculo liso modificadas de las arteriolas aferentes renales. Cada vez que se libera renina a la circulación, ésta hidroliza el angiotensinógeno, una

macroglicoproteína α_2 , que se sintetiza y libera constantemente por el hígado. El resultado de la hidrólisis catalizada por la renina es la angiotensina I (De Gasparo et al., 1995).

La síntesis de angiotensina II en los vasos tiene una importancia especial debido a sus múltiples acciones vasculares. La angiotensina II ejerce un efecto vasoconstrictor directo, incrementa la transmisión noradrenérgica simpática (Server et al., 1975), tiene acción mitogénica y trófica en la vasculatura (Dubey et al., 1992; Jackson et al., 1992) y estimula la liberación de adrenalina y noradrenalina de la médula suprarrenal. Además, la angiotensina II tiene efectos antinatriuréticos y antidiuréticos. Estimula la liberación de vasopresina de la hipófisis y de aldosterona de la corteza suprarrenal. Por la combinación de estas acciones, la angiotensina II participa de manera importante en la regulación de la presión sanguínea, del volumen de líquido extracelular, de la función cerebral y contribuye en el control del crecimiento celular (Schelling et al., 1992; Barnes et al., 1992).

La disponibilidad de ligandos peptídicos y no peptídicos permitió la caracterización de al menos dos subtipos de receptores a angiotensina II llamados AT_1 y AT_2 . Las principales acciones de la angiotensina II son descritas por su interacción con estos dos subtipos de receptores (Criscione et al., 1993; Blankley et al., 1991).

b) AGENTES VASODILATADORES

ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un importante vasodilatador que se genera en respuesta a la estimulación de receptores endoteliales por neurotransmisores, por hormonas (insulina, oxitocina, vasopresina y estrógenos) (Moncada et al., 1991) o como efecto compensatorio a la contracción de los vasos sanguíneos.

El NO es sintetizado a partir de la L-arginina, a través de un grupo de enzimas conocidas como sintetasas de óxido nítrico (NOS). Este grupo está integrado por tres isoformas; la endotelial (eNOS o NOS III), la inducible (iNOS o NOS II) y la neuronal (nNOS o NOS I). Estas enzimas catalizan la oxidación sucesiva de alguno de los dos residuos amino guanidino de la L-arginina para formar dos intermediarios inestables, la N^G-hidroxi-L-arginina y posteriormente la N^G-oxo-L-arginina de mayor estado de oxidación. De esta última se libera óxido nítrico y citrulina, por un reacomodo intramolecular (Moncada et al., 1989).

En condiciones fisiológicas normales, la eNOS es la única isoforma expresada en las células endoteliales. Esta enzima se localiza de manera constitutiva en la cara interna de la membrana celular, su activación es dependiente de calcio-calmodulina y es la responsable de producir óxido nítrico de manera basal y como respuesta compensatoria a estímulos vasoconstrictores (Wang et al., 1995).

El NO difunde al músculo liso, en donde activa la enzima guanilato-ciclase soluble, por lo cual aumentan los niveles celulares del segundo mensajero GMPc, en varios tejidos, incluyendo el músculo liso vascular y el

cerebro (Holzmann, 1982; Rapoport y Murad, 1983). La activación se realiza por la unión del óxido nítrico al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, que provoca un movimiento del grupo hemo de la proteína y un cambio conformacional que incrementa su actividad catalítica (Schmidt et al., 1993). El GMP_c es un segundo mensajero a través del cual se llevan a cabo muchas de las funciones del óxido nítrico, como la relajación de los vasos sanguíneos, inhibición de la agregación plaquetaria y la proliferación de las células del músculo liso vascular (Moncada et al., 1991). Se conocen dos isoformas de la guanilato ciclasa, la particulada (unida a la membrana) y la soluble (citoplásmica). La soluble es activada por el óxido nítrico, mientras que la particulada sólo se activa por péptidos atrial-natriuréticos (Jonhs, 1997).

BRADICININA

Las cininas son potentes polipéptidos producidos por enzimas proteolíticas a partir de las globulinas α_2 del plasma o los líquidos tisulares. Una de estas cininas es la bradicinina (BK), este nonapéptido es sintetizado por la enzima calicreína, que convierte a la α_2 -globulina en calidina y esta a su vez es convertida en bradicinina por la calicreína (Guyton y Hall, 1997).

La BK produce una gran variedad de efectos biológicos, como permeabilidad vascular, constricción pulmonar y uterina, dilatación de lechos viscerales, corazón y riñones. Algunos de estos efectos, son mediados por la liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas de las células cebadas (Golias et al., 2007). Además se sabe que estimula la liberación de NO,

prostaglandinas vasodilatadoras (PGI₂) y del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Tippmer et al., 1994).

Se han reportado dos receptores para bradicinina, B₁ y B₂; sin embargo, sus efectos son mediados principalmente por el B₂ (Regoli y Barabé, 1980). Este receptor se expresa constitutivamente en neuronas, corteza cerebral, corazón, pulmón y riñón.

El receptor B₂ se acopla a proteínas G y activa a las fosfolipasas A₂ y C. La activación de la fosfolipasa C inducida por cinina hace que aumente el inositol trifosfato (IP₃) y con ello el calcio citosólico, además aumenta el diacilglicerol (DAG). Se ha demostrado que la bradicinina activa a la proteína cinasa C dependiente de calcio y a la que no depende de este ion, así como a las isoformas atípicas (Tippmer et al., 1994). La estimulación de la fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana (Schrör, 1992).

Existen razones para afirmar que las cininas desempeñan un papel especial en la regulación del flujo sanguíneo y de la permeabilidad capilar a los líquidos en tejidos inflamados. Se conoce también que la bradicinina participa en la regulación del flujo sanguíneo en la piel, así como en las glándulas salivales y gastrointestinales (Guyton y Hall, 1997). También se ha descrito que participa en el mecanismo antihipertensivo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Linz et al., 1995).

Sin embargo, existe controversia en cuando a la participación de las cininas en la modulación de la presión sanguínea. Algunos reportes sugieren que la bradicinina no participa en el mantenimiento de la presión normal o en el desarrollo de la hipertensión (Milia et al., 2001; Rhaleb et al., 2001).

PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas (PGs) son un conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas del producto del metabolismo del ácido araquidónico por la acción de una familia de enzimas denominadas ciclooxigenasas (COX). Las prostaglandinas intervienen en una gran variedad de efectos biológicos, como en el aumento de la permeabilidad en tejidos, en la respuesta inflamatoria, en la vasoconstricción y vasodilatación del músculo liso vascular, sin embargo la mayoría de los efectos más importantes parecen ser principalmente como agentes vasodilatadores (Guyton y Hall, 1997).

Actualmente se conocen tres isoformas de las COX: la COX1 se expresa constitutivamente en diversos tejidos, entre ellos el endotelio y es la encargada de la producción basal de prostaglandinas para el mantenimiento de las funciones biológicas en las que éstas participan. Se ha asociado esta isoforma con la producción de prostaciclina (PGI_2); la COX2, esta isoforma es de naturaleza inducible, aunque se expresa constitutivamente en el riñón, y es la responsable de la sobreproducción de prostaglandinas en condiciones patológicas como la inflamación crónica (Grigold et al., 1996) y la COX3 que se descubrió en la corteza cerebral canina, es inhibida por drogas antipiréticas y analgésicas, por lo que podría estar involucrada en el mecanismo por el cual ejercen su acción (Chandrasekaran et al., 2002).

Las isoformas COX1 y COX2, catalizan los primeros dos pasos de la síntesis de las prostaglandinas, es decir; la oxidación del ácido araquidónico produciendo el hidroperoxi-endoperóxido PGG_2 y su subsecuente reducción a hidroxi-endoperóxido PGH_2 . La PGH_2 se transforma por mecanismos

enzimáticos y no enzimáticos en prostanoïdes primarios (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 y tromboxano A_2) (Vane et al., 1998).

La principal prostaglandina vasodilatadora es la prostaglandina I_2 (PGI_2), también conocida como prostaciclina. Es producida por las células endoteliales y la túnica íntima (Vane et al., 1998). Actúa vía proteína G mediante su receptor IP. La estimulación de los receptores IP activa a la guanilato ciclasa, lo que incrementa los niveles del AMPc intracelular, a su vez este activa a la proteína cinasa A, con la consecuente disminución de la actividad de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) causando vasodilatación. La PGI_2 también activa un receptor nuclear, el receptor activado por el proliferador de peroxisomas α ($\text{PPAR}\alpha$). La activación del receptor $\text{PPAR}\alpha$ junto con la estimulación del receptor IP pueden producir la vasodilatación en la vasculatura (Hurairah y Ferro, 2004).

La función de la prostaciclina es local, causando relajación del músculo subyacente y previniendo la agregación plaquetaria. Además, aumenta la actividad de enzimas que metabolizan los ésteres de colesterol en la célula muscular lisa, inhibe la acumulación de ésteres de colesterol por los macrófagos y previene la liberación de factores de crecimiento que causan engrosamiento de la pared vascular. La capacidad del endotelio para generar prostaciclina disminuye con la edad, en diabetes mellitus y en aterosclerosis (Vane et al., 1990). Además, tiene efecto sobre la resistencia vascular cortical renal, produciendo un aumento del flujo sanguíneo cortical renal con el consiguiente aumento del volumen intracelular y disminución de la resistencia periférica. De esta manera, junto con la aldosterona y la vasopresina, regulan de forma hormonal la presión arterial.

1.2.3.- CONTROL RENAL

El sistema renal ayuda a regular la presión sanguínea incrementando o disminuyendo el volumen sanguíneo mediante el mecanismo renina-angiotensina. Además, también se ha involucrado al sistema caliceína-cinina en el mecanismo renal de regulación de la presión.

a) SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

El sistema renina-angiotensina (RAS) es una cascada proteolítica, conectada a un sistema de traducción de señales en el que la renina transforma al angiotensinógeno en angiotensina I (Ang I) y ésta a su vez es convertida a angiotensina II (Ang II) por la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Este sistema contribuye al control de la presión sanguínea, controlando en volumen de fluido extracelular y mediante la síntesis de Ang II. La Ang II aumenta la contractilidad miocárdica, estimula la liberación de aldosterona y catecolaminas de la medula adrenal y de las terminaciones nerviosas simpáticas, incrementando la actividad del sistema nervioso simpático e incrementando la reabsorción de agua en los intestinos y el riñón (Corbol et al., 1995). Además, activa directamente las neuronas postganglionares simpáticas; activando los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje e incrementando el Ca^{+2} intracelular (Ma et al., 2001). Se ha demostrado que durante patologías como la hipertensión, tiene efectos sobre el remodelado vascular y el desarrollo de hipertrofia cardíaca, así como también conlleva a daño de tejidos por la activación de citocininas (Wolf y Ziyadeh, 1997).

b) SISTEMA CALICREINA-CININAS

La calicreína tiene como sustrato al cininógeno, del cual se liberan cininas vasoactivas. La principal cinina de este sistema es la bradicinina (BK), posee dos receptores el B₁ y B₂, sin embargo; se ha demostrado que los efectos biológicos de la bradicinina son mediados por el B₂, este receptor se expresa constitutivamente en corazón, cerebro, pulmón y vasculatura (Bhoola et al., 1992).

La unión de la BK a su receptor B₂, activa segundos mensajeros como GMPc y AMPc, induciendo la síntesis de NO y prostaciclina; desencadenando una serie de efectos biológicos como vasodilatación vascular, inflamación y dolor (Marceau, 1995; Regoli et al., 1990).

Este sistema tiene una conexión con el sistema renina-angiotensina, por medio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), ya que esta enzima además de catalizar la producción de Ang II, también es capaz de degradar a la BK a péptidos inactivos. La BK participa en el mecanismo hipotensor de los inhibidores de ECA (iECA), ya que el tratamiento con antagonistas B₂ atenúa el efecto hipotensor de los iECA (Linz et al., 1995; Gainer et al., 1998)

Las cininas participan en la regulación de la presión arterial, modulando la vasodilatación tanto en la arteria aferente como en la eferente, estimulando la síntesis de NO, PGI y liberación de renina (Ren et al., 2002; Feldstein et al., 2002).

2.- EL ENDOTELIO EN LA MODULACIÓN DEL TONO VASCULAR.

Las células endoteliales participan de manera importante en la regulación del tono vascular, participando directamente en la síntesis y liberación de diversas sustancias vasoactivas (Fig. 2).

Anteriormente, se consideraba que el endotelio únicamente delimitaba el interior de los vasos sanguíneos y que servía como barrera entre el plasma y tejido, y que su función era evitar el desgaste del músculo liso vascular. Actualmente se sabe que es un órgano responsable de regular procesos hemodinámicos, metabólicos, sintéticos, inflamatorios, protrombogénicos, antitrombogénicos y de remodelado vascular. (Furchgott, 1983; Gryglewski et al., 1988) y que además es capaz de producir sustancias vasodilatadoras (NO, PGI₂, FHDE) y vasoconstrictoras (Ang II, anión superóxido, tromboxano A₂, prostaglandinas H₂) (Lüscher et al., 1991; 1993). Estos mediadores químicos son liberados por las células endoteliales en respuesta a factores físicos (aumento en el flujo sanguíneo) y otras sustancias vasoactivas (Moncada et al., 1991; Lüscher et al., 1993) liberadas por terminaciones nerviosas (noradrenalina) o por las plaquetas (serotonina) (Dohi et al., 1996).

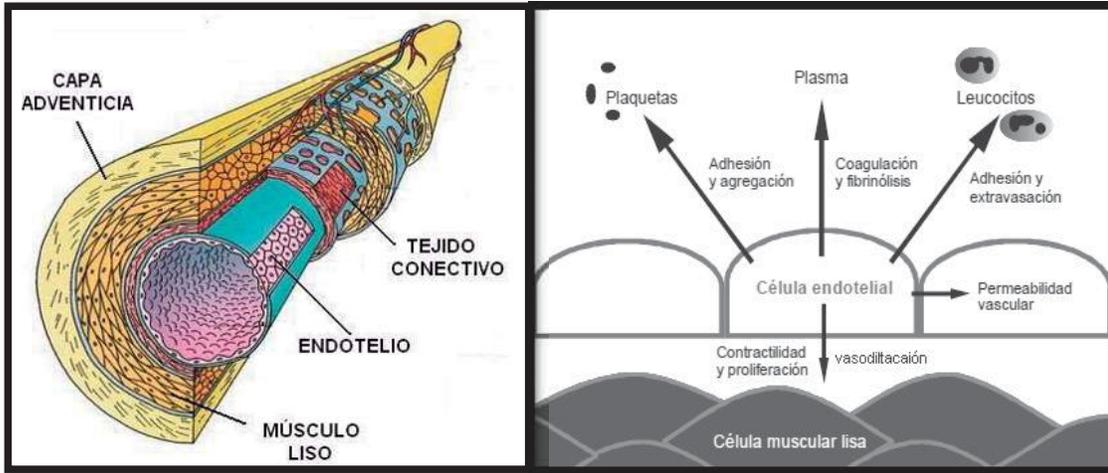


Figura 2. Endotelio vascular. Funciones del endotelio vascular.

3.- ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El endotelio vascular es un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo. Está conformado por una mono capa celular que recubre el interior los vasos sanguíneos, por lo que anteriormente se le consideraba como sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos. En la actualidad se le considera como un órgano capaz participar de manera importante en la modulación local del tono vascular, además participa en una gran variedad de procesos hemodinámicos, metabólicos, sintéticos, inflamatorios, antitrombogénicos, protrombogénicos y de remodelado vascular (Goligorsky et al., 2001; Furchgott, 1983; Gryglewski et al., 1988).

Los primeros hallazgos sobre la funcionalidad del endotelio se realizaron en 1980 cuando Furchgott demostró que la respuesta vaso-relajante de la acetilcolina (ACh) en anillos aislados de aorta torácica de conejo era dependiente de su concentración en arterias con endotelio y al remover la capa endotelial la ACh no presentaba efecto alguno. Esto dio origen a la hipótesis de que el endotelio liberaba una sustancia responsable de la relajación inducida por ACh (Furchgott et al., 1980).

Observaciones posteriores demostraron que además de la ACh, existía otra sustancia vaso-activa endógena capaz modificar el tono vascular y producir relajación únicamente en presencia del endotelio; esta sustancia se le denominó “Factor relajante derivado del endotelio” (FRDE) (Furchgott et al., 1984). Años más tarde se demostraría que el “FRDE” correspondería al óxido nítrico (Ignarro et al., 1987; Moncada et al., 1988).

Como se ha descrito anteriormente, el endotelio sintetiza sustancias vasodilatadoras capaces de influir en la regulación de la contracción de los vasos sanguíneos, esto se demuestra claramente cuando al remover el endotelio de arterias y venas se observa un aumento en la sensibilidad del músculo liso vascular a diferentes agentes contráctiles. En las aortas con endotelio intacto se presenta una contracción menor a la observada en aquellas sin endotelio (Criscione et al., 1984; Egleme et al., 1984; Bullock et al., 1986), esta disminución en la contracción de las aortas con endotelio es atribuida a las liberación de óxido nítrico, ya que la inhibición de su síntesis imita los efectos de la remoción del endotelio (Dohi et al., 1996; Dowell et al., 1999; Matsuda et al., 2000).

Además, de la participación fundamental en el mecanismo de regulación del tono vascular, al endotelio también se le ha involucrado en procesos patológicos como la hipertensión. Se ha descrito una disminución en la vasodilatación dependiente del endotelio durante dicha patología (Dominiczak y Borh, 1995), lo que concuerda con reportes donde se establece que existe una disminución en la síntesis de óxido nítrico (Ibarra et al., 1995; Dohi et al., 1996). Adicional a esto, se ha observado una reducción en la capacidad del endotelio para contrarrestar los efectos vasoconstrictores de los agonistas adrenérgicos α_1 (Osugi et al., 1990), y se ha sugerido que estos receptores podrían estar involucrados en la génesis y mantenimiento de la hipertensión (Gisbert et al, 2002). Otros reportes muestran que la población de receptores adrenérgicos α_{1D} y AT1 se encuentra aumentada en ratas SHR antes del desarrollo de la hipertensión (Schiffrin, 1984).

A nivel vascular se ha demostrado que existe relación entre el SRA y el sistema adrenérgico, ya que el bloqueo de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con altas dosis de captopril es capaz de inhibir la hipersensibilidad vascular a la fenilefrina (Chen et al., 1995; Zicha y Kunes, 1999). Además se sabe que la Ang II induce la expresión de receptores α_{1D} adrenérgicos en cultivos celulares de músculo liso de aorta de rata (Hu, 1995), así mismo; en animales prehipertensos SHR se ha observado que el tratamiento con dosis bajas de captopril disminuye la expresión y función de estos receptores (Godínez-Hernández et al., 2006). Estos antecedentes, nos sugiere que la angiotensina II pudiera estar contribuyendo al desarrollo de la hipertensión de manera indirecta, estimulando la expresión y función de los receptores α_{1D} .

Por otro lado, se ha propuesto a la bradicinina como otro agente vasodilatador involucrado en la regulación de la presión sanguínea, ya que es capaz de estimular la liberación de óxido nítrico y prostaglandinas vasodilatadoras; sin embargo su participación es contradictoria. Se sabe que el bloqueo de receptores B_2 de la bradicinina atenúa el efecto hipotensor de los inhibidores de la ECA, por lo se establece que este péptido contribuye en los efectos hemodinámicos de los inhibidores de la ECA tanto en animales como en personas hipertensas (Carretero et al., 1981, Linz et al., 1995). Además, se ha reportado que en ratas SHR se presenta una disminución tanto en la actividad de la cininogenasa como en la excreción de calicreína (Oza y Danana, 1992; Ader et al., 1987), sugiriendo que una disminución en la síntesis de cininas podría estar involucrada en el desarrollo de la hipertensión. La asociación entre la baja excreción urinaria de calicreína y el aumento en la presión arterial se ha

confirmado en la cepa de ratas con calicreína baja que presenta presión arterial alta y un aumento en los efectos presores inducidos por sal (Madeddu et al., 1997).

Otros reportes de ratas knockout del receptor B₂ en los cuales no se presentó modificación de la presión, sugieren una nula participación por parte de las cininas en la regulación de presión (Milia, 2001).

Estudios empleando antagonistas de bradicinina sugieren que las cininas endógenas contribuyen a la regulación del flujo sanguíneo y de la función renal al ejercer un efecto vasodilatador en el riñón (Romen et al., 1988), otra participación potencial de la calicreína-cinina renal se demostró en la rata deficiente de cininógeno (Brown Norway–Katholiek), esta cepa no genera cininas y es susceptible al desarrollo de la hipertensión (Majima et al., 1994).

4.- JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México, la hipertensión ocupa los primeros lugares de causas de morbilidad y mortalidad. Se estima que existen aproximadamente 17 millones de mexicanos con esta enfermedad y más de la mitad de ellos, lo no sabe. Esto se debe a que en sus inicios no presenta síntomas y es hasta que ya se ha presentado daño a algún órgano que el paciente conoce sobre su padecimiento.

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones se han centrado en establecer los factores involucrados en el mantenimiento de la presión arterial alta, así como también en el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos. Sin embargo, es necesario profundizar sobre los principales mecanismos que intervienen en la génesis y desarrollo de la hipertensión. Por lo que este trabajo pretende contribuir al esclarecimiento de la fisiopatología del desarrollo de la hipertensión, mediante el estudio del sistema calicreína-cinina, el cual se ha relacionado con la génesis de dicha patología.

5.- HIPÓTESIS

La hipertensión promueve un incremento en las respuestas adrenérgicas y una disminución en la vasodilatación mediada por bradicinina en aorta y riñón de rata.

6.- OBJETIVO

Analizar la respuesta adrenérgica y la participación de la bradicinina en aorta y riñón de ratas hipertensas.

7.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la participación de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas renales en ratas hipertensas.
2. Determinar la participación de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas vasculares en ratas hipertensas.

8.- MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 semanas de edad. Todos los procedimientos experimentales se realizarán de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Secretaria de Agricultura, México).

La inducción de la hipertensión se realizó con *N* ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Este fármaco es un inhibidor competitivo de las óxido nítrico sintasas, por lo que produce una disminución en la síntesis de óxido nítrico (Küng et al., 1995; Furfine et al., 1993). De esta manera, la administración crónica de L-NAME produce hipertensión (Baylis, 1992).

Aunque existen diversos medicamentos antihipertensivos, uno de los principales fármacos usados es el captopril. Este antihipertensivo actúa inhibiendo a la ECA, esta enzima forma parte del sistema renina angiotensina y es la responsable de convertir a la angiotensina I en angiotensina II. Se sabe que durante la hipertensión las síntesis de angiotensina II se encuentra aumentada (Ruiz et al., 1990), por lo que este tipo de tratamiento es ampliamente utilizado.

Las ratas utilizadas se dividieron en 4 diferentes grupos:

GRUPO 1: CONTROL	AGUA	DOSIS L-NAME 75mg/kg CAPTOPRIL 30mg/kg
GRUPO 2: HIPERTENSAS	L-NAME	
GRUPO 3: HIPERTENSAS TRATADAS	L-NAME+CAPTOPRIL	
GRUPO 4: CAPTOPRIL	CAPTOPRIL	

Los tratamientos se administraron en el agua de beber por 4 semanas y se monitoreo el peso de las ratas para ajustar la dosis de cada tratamiento.

Para cada grupo, se realizaron curvas concentración respuesta a la fenilefrina en riñón asilado y perfundido y curvas concentración respuesta a la bradicinina en aorta, en ausencia y presencia del antagonista del receptor B₂ de bradicinina (HOE 140).

8.1.- RIÑÓN ASILADO Y PERFUNDIDO

Para realizar la extracción del riñón, se utilizó la técnica de riñón aislado y perfundido, en la cual primeramente se anestesió a la rata utilizando pentobarbital sódico a una dosis de 60mg/kg. Una vez inducida la anestesia profunda, se realizó una incisión abdominal en forma vertical. Se expusieron los órganos y se localizó la arteria mesentérica que irriga al riñón. Posteriormente, se canuló y se perfundió el riñón, se extrajo y se colocó en la cámara para órgano asilado y perfundido.

Una vez colocado el riñón en la cámara, se perfundió con solución Krebs, a pH 7.4, burbujeada con una mezcla de gas carbógeno al 95% de O₂ - 5% de CO₂, a 37 °C (ver anexo 1). El flujo se ajustó a 10 ml/min para obtener una presión basal. El incremento en la presión de perfusión se midió utilizando un transductor de presión (Grass) adaptado a un sistema de adquisición de datos (Biopac). El aumento en la presión de perfusión se interpretó como un índice de cambio en la resistencia en la arterial renal y por lo tanto como un efecto vasoconstrictor inducido por la fenilefrina.

Se determinó la participación de la bradicinina en la modulación de la presión de perfusión en respuesta a la fenilefrina bajo el siguiente protocolo:

Una vez colocado el riñón en la cámara para órgano aislado y perfundido, se dejó en periodo de estabilización alrededor de 15 min. Pasado este tiempo, la presión de perfusión registrada se tomó como presión de perfusión basal.

Para la curva concentración-respuesta a la fenilefrina, se utilizaron dosis crecientes de fenilefrina ($1 \times 10^{-9} \text{M}$ – $1 \times 10^{-3} \text{M}$), en presencia y ausencia de HOE 140 (antagonista B_2 de bradicinina) a dosis de $1 \times 10^{-9} \text{M}$. El antagonista se administró en infusión constante con ayuda de una bomba de infusión (Kd scientific, USA), a un volumen de 10ml/hr. Además se utilizó rauwolscina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) y propranolol ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) antagonistas α_2 y β , respectivamente. Lo anterior para asegurar que las respuestas vasoconstrictoras a la fenilefrina fueran únicamente vía receptor α_1 . En estas condiciones se midió el incremento en la presión de perfusión al adicionar las diferentes dosis de fenilefrina.

8.2.- TEJIDO AISLADO

Para la extracción de la aorta, se anestesió a la rata utilizando pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg. Una vez inducida la anestesia profunda, se realizó una incisión abdominal en forma vertical. Se expusieron los órganos y se localizó la aorta. Se extrajo y se colocó en un recipiente con solución Krebs y burbujeo con carbógeno, se limpió de tejido graso. Se seccionó en anillos de aproximadamente 3 mm de largo y se colocó en la cámara para órgano aislado en 10 ml de solución Krebs a pH 7.4, burbujeada con una mezcla de gas carbógeno al 95% de O₂ / 5% de CO₂, a 37 °C. Posteriormente, los anillos se fijaron a la parte inferior de la cámara para órgano aislado (sostenidos por ganchos de nicrom) y a transductores Grass acoplados a un sistema de adquisición de datos (BIOPAC Systems, Inc, modelo MP100A), registraron los cambios en la tensión isométrica. Los anillos aórticos se sometieron a una tensión inicial de 3 gramos.

Se determinó la participación de la bradiginina sobre las respuestas adrenérgicas vasculares, bajo el siguiente protocolo:

Los anillos aórticos con y sin endotelio ya sometidos a la tensión isométrica antes mencionada, se les dejó en periodo de estabilización por 30min. Posteriormente se realizó en 3 ocasiones una sensibilización con fenilefrina ($1 \times 10^{-4} \text{M}$), lavando el tejido 3 veces entre cada sensibilización.

Después de las sensibilizaciones, se precontrajo el tejido con fenilefrina (1×10^{-4} M). Una vez obtenido el efecto máximo, se comenzó con la curva dosis respuesta a la bradicinina utilizando rauwolscina (1×10^{-7} M) y propranolol (1×10^{-7} M) para antagonizar las respuestas adrenérgicas α_2 y β , respectivamente. Las curvas se realizaron presencia y ausencia de HOE 140 (antagonista B_2 de bradicinina). Posteriormente, se midió la disminución en la contracción producida al adicionar la bradicinina.

9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los datos representan el promedio \pm el error estándar de 6 anillos aórticos y de 4 riñones de animales diferentes. Para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre cada tratamiento con los inhibidores y el antagonista empleados, se realizaron análisis de varianza de dos vías, seguidos de la prueba Tukey.

10.- FARMACOS EMPLEADOS

El clorhidrato de fenilefrina, la rauwolscina y el propranolol fueron comprados en Research Biochemicals International (Natick, MA, USA) y se disolvieron en agua destilada. El cloruro de carbamilcolina (carbacol) y el HOE 140 se adquirieron en Sigma-Aldrich Química (México), el carbacol se disolvió en agua destilada y carbonato de sodio al 9%. La bradiginina fue adquirida en Sigma y se diluyó en agua destilada.

11.- RESULTADOS

11.1.- EFECTO DE LA BRADICININA SOBRE LAS RESPUESTAS ADRENERGICAS RENALES.

a) PRESIÓN DE PERFUSIÓN BASAL

Antes de iniciar cada experimento, se registró la presión de perfusión que presentaron los riñones de las ratas de cada uno de los tratamientos, es decir la presión de perfusión basal. Este parámetro se mide en milímetros de mercurio (mm de Hg).

Como se puede observar la presión de perfusión de los riñones de rata control fue de aproximadamente 110 mm de Hg, lo que se encuentra dentro de los niveles normales de presión. Los riñones de ratas hipertensas, registraron una presión por arriba de los 150 mm de Hg, esto indica que el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME) produce un incremento en la presión de perfusión renal. Las ratas hipertensas que fueron tratadas con captopril no presentaron diferencia estadísticamente significativa comparada con el control, así como tampoco se observaron diferencias en la presión de perfusión de los riñones de las ratas que fueron tratadas únicamente con captopril (figura 3).

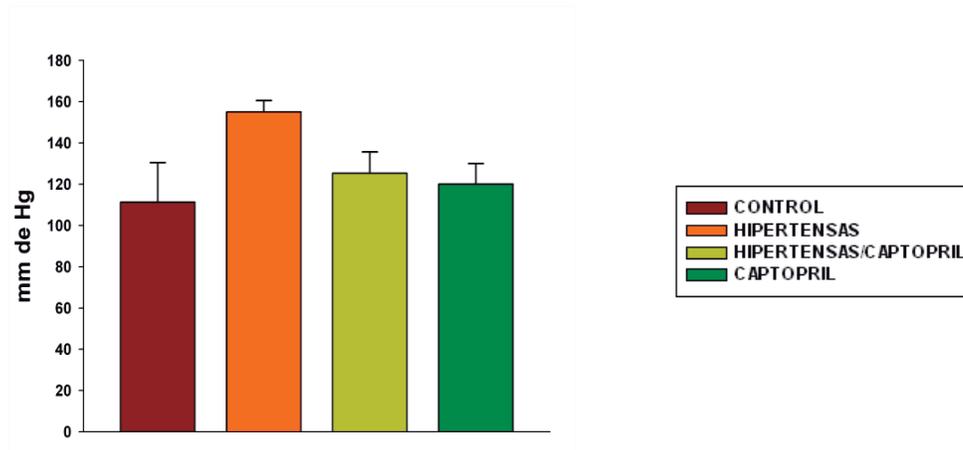


Figura 3. Presión de perfusión basal. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 4 riñones. * $p < 0.05$ vs. control, prueba de tukey.

b) DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA BRADICININA SOBRE LAS RESPUESTAS ADRENERGICAS RENALES.

Para determinar la participación de la bradicinina en la modulación de la presión de perfusión renal durante la administración de fenilefrina, se realizaron dos curvas: una curva bajo condiciones control y una segunda curva infundiendo constantemente HOE 140 (antagonista B_2 de bradicinina).

En los cuatro grupos analizados, la fenilefrina produjo un incremento en la presión de perfusión dependiente de la dosis, tanto en las curvas control como en las que se infundió HOE 140.

Se ha reportado que la bradicinina participa en la hemodinámica renal, mediante la regulación de la resistencia vascular de las arterias aferente y eferente (Ren et al., 2002). Lo anterior se puede apreciar en la grafica 2A, donde al antagonizar las repuestas de la bradicinina el efecto en la presión de perfusión inducido por la fenilefrina es mayor comparado con el control.

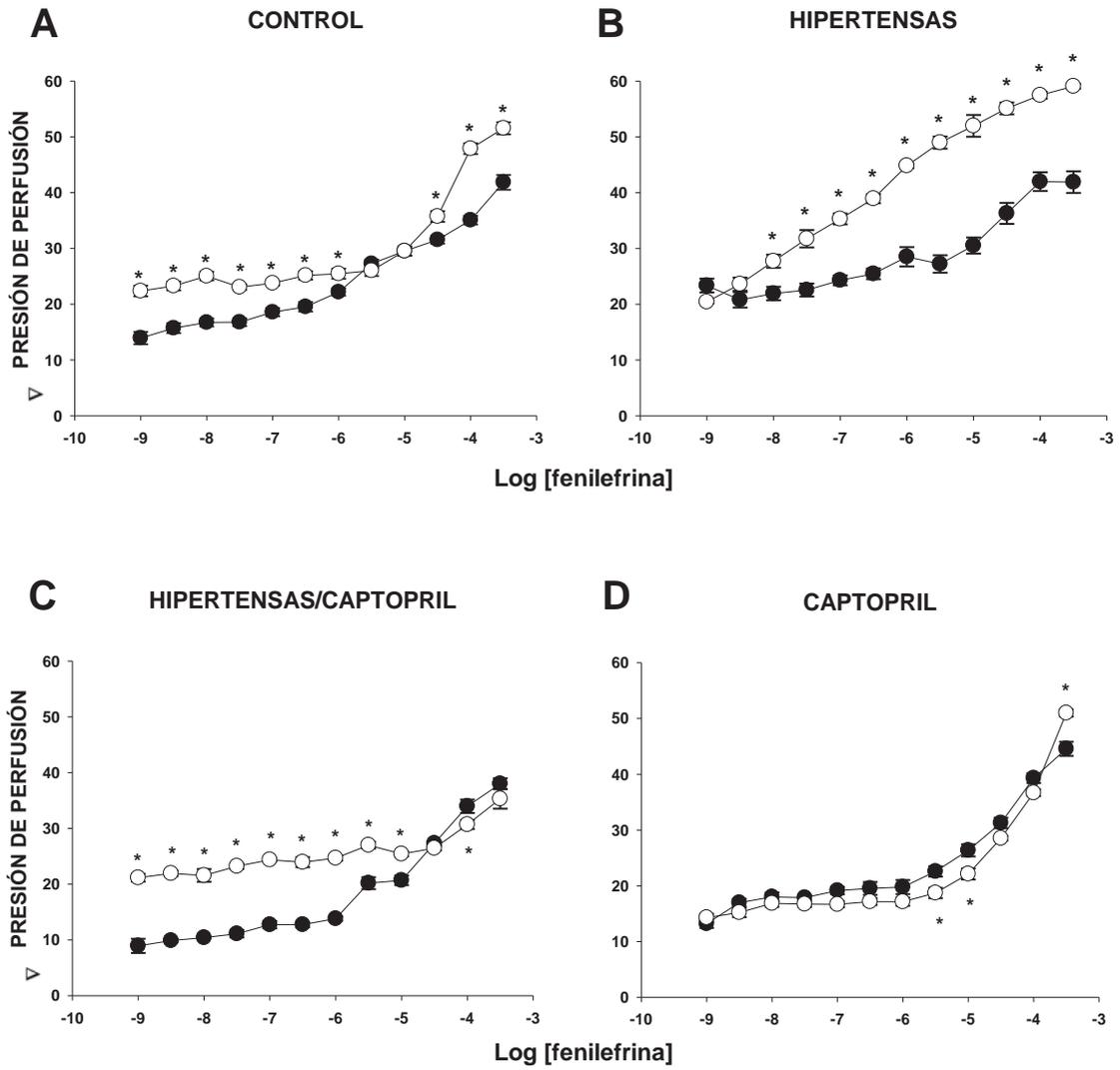


Figura 4. Incremento en la presión de perfusión renal en respuesta a la fenilefrina en riñones control (●) y en riñones infundidos constantemente con HOE 140 (○). Cada valor representa la media ± el error estándar de 4 riñones. * p<0.05 vs. control, tukey.

Por otro lado, se puede observar que los riñones de las ratas hipertensas presentaron la hipersensibilidad a la fenilefrina característica de los vasos sanguíneos de animales hipertensos (Zicha y Kunes, 1999). Al realizar las curvas con el antagonista B₂ se observó un aumento en las respuestas adrenérgicas, con un incremento del 40% en el efecto máximo de la fenilefrina. Esto nos sugiere que durante la hipertensión, la bradicinina contribuye a la regulación, de manera importante, la presión sanguínea renal, ya que al inhibir las respuestas vasodilatadoras mediadas por la bradicinina se observa un incremento en la presión de perfusión en respuesta a la fenilefrina (figura 4B).

El tratamiento de las ratas hipertensas con captopril, disminuyó la hipersensibilidad a la fenilefrina que se presentaba en el riñón de las ratas hipertensas, lo que concuerda con reportes donde se demuestra que el tratamiento con captopril es capaz de disminuir la sensibilidad a la fenilefrina que se presenta durante la hipertensión (Chen et al, 1995). Cuando se realizó la curva con infusión constante con HOE 140, el efecto de la fenilefrina fue mayor al observado en la curva control; sin embargo la respuesta máxima no se modificó (figura 4C).

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre la curva control y la curva con el antagonista B₂ de los riñones de las ratas tratadas con captopril, esto podría deberse a una disminución en la funcionalidad de los receptores a bradicinina, ya que se ha demostrado que la angiotensina II es capaz modular la expresión de receptores B₂ (Tan et al., 2004).

Los resultados anteriores, nos sugieren que durante la hipertensión la bradicinina forma parte importante de los mecanismos vasodilatadores que regulan la presión sanguínea renal.

11.2.- EFECTO DE LA BRADICININA SOBRE LAS RESPUESTAS ADRENÉRGICAS VASCULARES.

Para la determinación de la participación de la bradicinina sobre las respuestas adrenérgicas vasculares, se utilizaron anillos aórticos con y sin endotelio; a los que se les realizó una curva dosis-respuesta a la bradicinina en presencia y ausencia del antagonista B₂ (HOE 140), utilizando fenilefrina para precontraer el tejido y observar la vasodilatación mediada por este péptido.

a) PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN LA REGULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN.

Para la determinación de este parámetro se adicionó fenilefrina (1×10^{-4} M) en la cámara para tejido aislado en anillos aórticos con y sin endotelio y se midió el efecto máximo.

Como se puede observar la fenilefrina produjo una contracción de aproximadamente 1g en los anillos aórticos de ratas control, mientras que en los anillos de las ratas hipertensas se observa hipersensibilidad a la fenilefrina (Zicha y Kunes, 1999) y el tratamiento de las ratas hipertensas con captopril no es capaz de disminuir esta hipersensibilidad observada en las ratas hipertensas. Los anillos aórticos de las ratas tratadas con captopril no presentaron diferencia estadísticamente significativa comparada con los anillos de las ratas control.

La disminución en la contracción de las arterias con endotelio intacto se atribuye a la liberación de óxido nítrico (Dowell et al., 1999), así; durante la

hipertensión se ha observado una disminución en la vasodilatación mediada por el endotelio (Dohi et al., 1996).

La remoción endotelial, produjo un aumento en la sensibilidad a la fenilefrina en los anillos de ratas control, hipertensas e hipertensas tratadas, sin embargo no se encontró diferencias en los anillos con y sin endotelio de las ratas tratadas con captopril, debido probablemente a la disminución en la expresión de receptores adrenérgicos α_1 que se presenta durante el tratamiento con captopril (Godínez-Hernández, 2006).

Las diferencias que se presentan entre los anillos con y sin endotelio, nos indica la participación del endotelio en la modulación de la contracción, es decir; los anillos con endotelio intacto, son capaces de activar mecanismos compensatorios que contrarresten los efectos vasoconstrictores de la fenilefrina. Por otro lado, los anillos a los que se les removió el endotelio; carecen de sustancias vasodilatadoras que modulen la contracción.

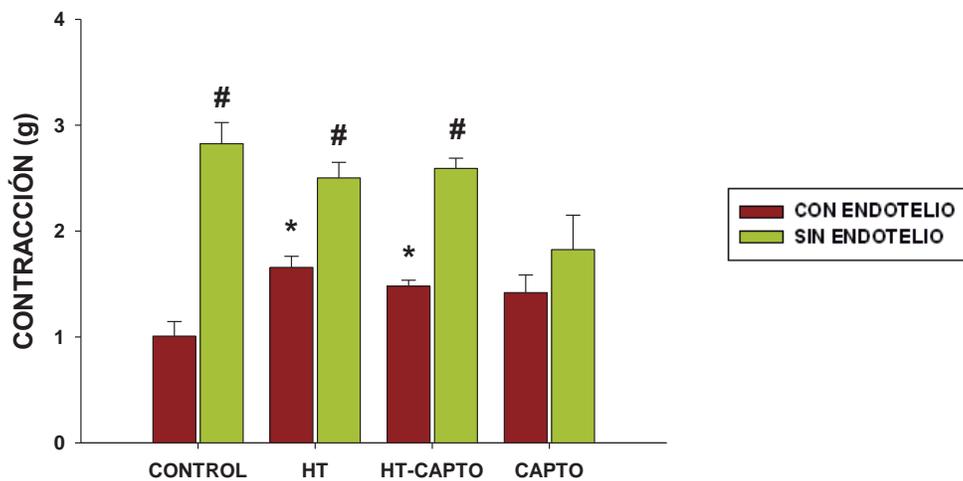


Figura 5. Precontracción de anillos aórticos. Se muestra la contracción a fenilefrina ($1 \times 10^{-4}M$) en anillos aórticos con y sin endotelio. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 6 anillos. * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.005$ vs. anillo con endotelio, tukey.

b) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA BRADICININA SOBRE LAS RESPUESTAS ADRENERGICAS

Al realizar las curvas con anillos aórticos con y sin endotelio e incubados con HOE 140, se evidenció la capacidad moduladora de la bradicinina y otros agentes vaso-relajantes derivados del endotelio. En los anillos de rata control y tratadas con captopril, el endotelio es capaz de activar mecanismos alternos como el óxido nítrico, para contrarrestar la vasoconstricción de la fenilefrina. Por el contrario, en anillos de ratas hipertensas e hipertensas tratadas con captopril; no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los anillos con y sin endotelio, esto debido a que durante la hipertensión se presenta una disminución en los efectos vaso-relajantes del óxido nítrico y adicional esto, se encuentran antagonizadas las respuestas a la bradicinina. Es decir, no existe participación vasorrelajante de la bradicinina ni del óxido nítrico que pueda modular la contracción a la fenilefrina (figura 6).

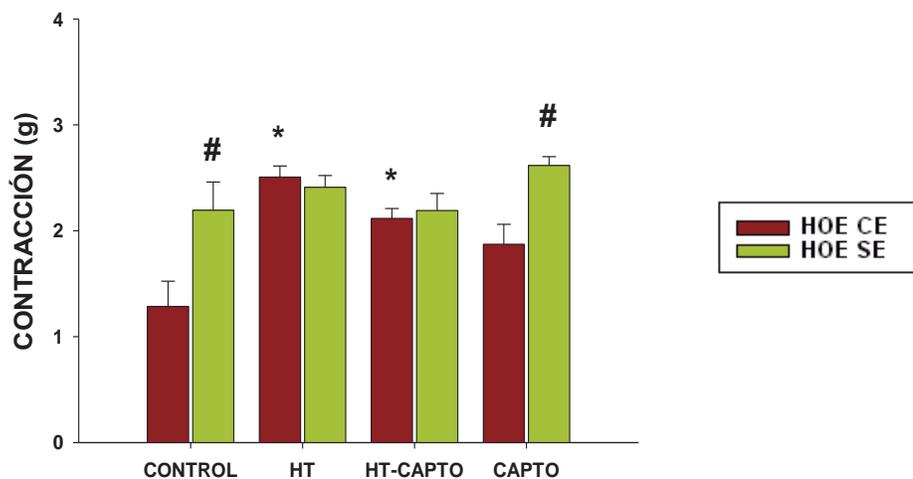


Figura 6. Anillos aórticos incubados con HOE 140. Se muestra la contracción a fenilefrina ($1 \times 10^{-4} M$) en anillos aórticos con y sin endotelio incubados con HOE 140. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 6 anillos. * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.005$ vs. anillo con endotelio, prueba de tukey.

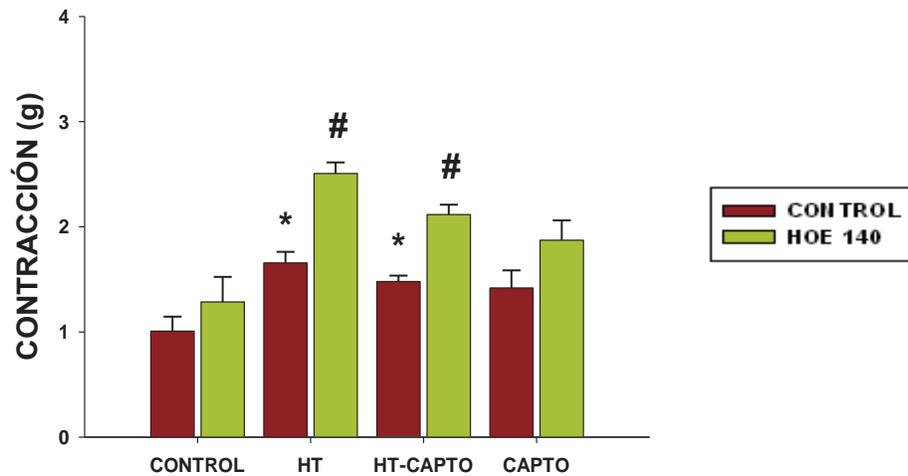


Figura 7. Anillos aórticos con y sin HOE 140. Se muestra la contracción a fenilefrina ($1 \times 10^{-4} M$) en anillos aórticos con y sin HOE 140. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 6 anillos. * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.005$ vs. anillo con endotelio, prueba de tukey.

En condiciones normales, el sistema de las cininas parece no participar de manera importante en la regulación del tono vascular, ya que no se observó diferencia significativa en los anillos de las ratas control con y sin HOE 140. Sin embargo, durante la hipertensión la bradicinina si contribuye en gran medida en la modulación de la contracción vascular, ya que al antagonizar el receptor B_2 , la contracción a la fenilefrina aumenta en un 50%. Lo anterior demuestra que durante la hipertensión, la bradicinina es fundamental en la modulación del tono vascular (figura 7).

Al realizar la curva dosis-respuesta a la bradicinina en los anillos aórticos precontraídos, el efecto se enmascaró por la contracción a la fenilefrina, es decir; el incremento en la contracción provocó que el endotelio activara mecanismos vasodilatadores como la bradicinina, para contrarrestar el efecto vasoconstrictor de la fenilefrina. Por lo anterior, se puede deducir que el sistema alcanzó su efecto máximo al participar en la modulación de la

precontracción, de esta manera; no se observó efecto al adicionar bradicinina (figura 8 A,B,C y D).

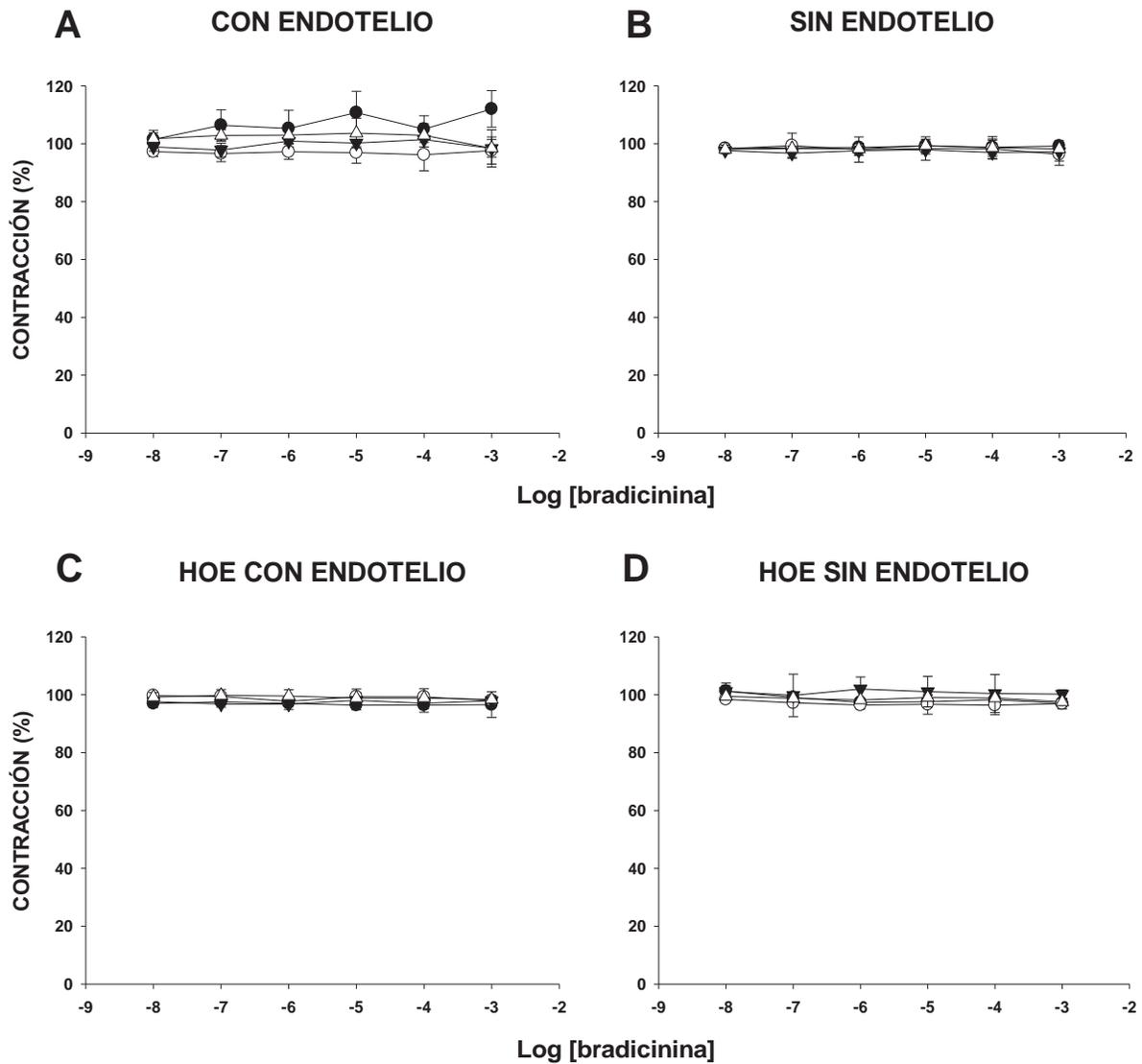


Figura 8. Porcentaje de contracción. Se muestra el porcentaje de contracción en anillos aórticos con y sin endotelio y en presencia o ausencia de HOE 140 en ratas control (●), ratas hipertensas (○), ratas hipertensas tratadas con captopril (▼) y ratas tratadas con captopril (△). Cada valor representa la media \pm el error estándar de 6 anillos. * $p < 0.05$ vs. control, tukey; sin diferencias estadísticas.

12.- DISCUSIÓN

Diversos estudios señalan que el endotelio vascular participa de manera importante en la modulación de la respuesta contráctil a la fenilefrina, sin embargo; durante la hipertensión esta contribución se ve disminuida (figuras 4A y 5). Se ha señalado que el endotelio puede sufrir disfunción, insuficiencia y daño; a estas alteraciones se les conoce como síndrome de disfunción endotelial (Goligorsky et al., 2001) y existe evidencia que muestra que este desorden se presenta durante la hipertensión (Bell et al., 1998).

Además, el tratamiento con captopril disminuyó la hipersensibilidad a la fenilefrina que se observó en la vasculatura de las ratas hipertensas (figura 4C), lo que concuerda con lo ya reportado en otros trabajos (Chen et al, 1995; Zicha y Kunes, 1999).

Por otro lado, existe controversia acerca de la participación de la bradicinina en el mecanismo vasodilatador endotelial. Algunos trabajos sugieren que este péptido carece de importancia en la modulación de la presión (Milia, 2001), sin embargo; otros reportes sugieren que una disminución en la síntesis de cininas podría estar relacionada con el desarrollo de la hipertensión (Oza y Danana, 1992; Ader, et al., 1987; Madeddu et al., 1997).

En este trabajo se encontró que la bradicinina actúa de manera tejido dependiente, ya que a nivel renal se observó que era capaz de modular la presión de perfusión (figura 3A), mientras que en los anillos aórticos no presentó actividad (figura 7). No obstante, durante la hipertensión; se demostró que esta participación es fundamental tanto en la regulación de la presión (figura 2B) como en el mantenimiento del tono vascular (figura 7).

Se conoce que la angiotensina II incrementa la expresión de receptores adrenérgicos α_{1D} y que el tratamiento con captopril disminuye la población de estos receptores (Hu et al., 1995; Godínez-Hernández, 2006), probablemente de esta manera; el tratamiento de ratas hipertensas con captopril, disminuye la hipersensibilidad a la fenilefrina (figura 3 y 4C).

Probablemente, las contradicciones en torno a la importancia de la bradicinina en la regulación de la presión arterial sean debido a que su participación es tejido dependiente y a que se activa durante procesos patológicos como la hipertensión.

13.- CONCLUSIONES

La hipertensión promueve un incremento en las respuestas adrenérgicas vasculares y renales.

La vasodilatación mediada por la bradicinina se ve incrementada durante la hipertensión.

14.- PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos, demuestran a nivel funcional, la participación de la bradicinina durante la hipertensión. Sin embargo, resulta interesante analizar la expresión de su receptor B₂, así como conocer los mecanismos involucrados en su regulación. Lo anterior, con el objeto de establecer alteraciones a nivel molecular que pudieran desencadenarse en el sistema durante dicha patología.

15.- REFERENCIAS

- Aantaa R., Majamaki A., Scheinin M. (1995). Molecular pharmacology of α_2 -adrenoceptors subtypes. *Anuans of medicine*. 27:439-449.
- Ader J. L., Tran-van T., Praddaude F. (1987). Reduced urinary kallikrein activity in rats developing spontaneous hypertension. *Am. J. Physiol.* F964-F969.
- Barnes J.M., Barnes N.M., Costall B., Coughlan J., Kelly M.E., Naylor R.J., Tomkins D.M. (1992). Williams TJ: Angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin, and cognition. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 19(suppl 6):S63-S71.
- Baylis C., Mitruka B., Deng A. (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin Invest.* 90(1): 278–281.
- Bell D., Johns T. E., Lopez L.M. (1998). Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases. *Ann Pharmacother.*32:459–470.
- Bhoola K.D., Figueroa C.D., Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44:1–80.
- Blankley C.J., Hodges J.C., Klutchko S.R., Himmelsbach R.J., Chucholowski A., Connolly C.J., Neergaard S.J., Van Nieuwenhze M.S., Sebastian A., Quin J. (1991). Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptideangiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT2 subtype. *Journal of medicinal chemistry*. 34:3248-3260.
- Bradley S.E. (1948). Physiology of essential hypertension. *Am JMed.* 4: 398-418.
- Bullock G.R., Taylor S.G., Weston A.H. (1986). Influence of the vascular endothelium on agonist-induced contractions and relaxations in rat aorta. *British journal of pharmacology*. 89:819-830.
- Bylund D.B. (1992). Subtypes of α_1 and α_2 -adrenergic receptors. Federation of American Societies for *Experimental Biology Journal*. 6:832-839.
- Bylund D.B., Eikenberg D.C., Heible J.P., Langer S.Z. (1994). Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Trendelenburg U: International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews*. 46:121-136.
- Carretero O.A., Miyazaki S., Scicli A.G. (1981). Role of kinins in the acute antihypertensive effect of the converting enzyme inhibitor captopril. *Hypertension*. 3:18-22.
- Chandrasekharan N.V., Hu D., Turepu R.L.K., Evason K.N., Tomsik J., Elton S.T., Simons L.D. (2002). COX3, a ciclooxyhenase-1 variant inhibet by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *PNAS*. 99(21):13926-13931.
- Chen D.G., Jin X.Q., Wan, H.J., Chen S.C. (1995). Mechanisms responsible for sustained hypotension after captopril treatment. *J. Hypertension*, 13, 1113–1121.

- Corvol P., Jeunemaitre X., Charru A., Kotelevtsev Y., Soubrier F. (1995) Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: new insights from molecular genetics. *Hormone Res.* 50, 287–308
- Criscione L., Muller K., Prescott M.F. (1984). Endothelial cell loss enhances the pressor response in resistance vessels. *Journal of hypertension.* 2(suppl 3):441-444.
- Criscione L., Muller K., Prescott M.F. (1985). Endothelial cell loss enhances the pressor response in resistance vessels. *Journal of hypertension.* 2(suppl 3):441-444.
- Dohi Y., Kojima M., Sato K. (1996). Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 28:732-737.
- Dominiczak A.F., Bohr D.F. (1995). Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension.* 25:1202-1211.
- Dowell F.J., Martin W., Dominiczak A.F., Hamilton C.A. (1999) Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke prone spontaneously hypertensive rat. *European journal of pharmacology.* 379:175-182.
- Dubey R.K., Roy A., Overbeck H.W. (1992). Culture of renal arteriolar smooth muscle cells: mitogenic responses to Ang II. *Circulation research.* 71:1143-1152.
- Egleme C., Godfraind T., Miller R.C. (1984). Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of endothelial cells. *B J Phar.* 81:16-18.
- Erdös E.G. (1975). Angiotensin I converting enzyme. *Circulation research.* 36:247-255.
- Feldstein C.A., Junco L.A., Romero J.C. (2002). La afectación renal en la hipertensión arterial esencial. De la genética a la protección por la terapia antihipertensiva. *Art Rev. Revista argentina de cardiología.* 70:329-336.
- Furchgott R.F. (1983). Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation research.* 53:557-573.
- Furchgott R.F. (1984). Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 24:175-197.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-376.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-376.
- Furfine E.S., Harmon M.F., Paith J.E., Garvey E.P. (1993). Selective Inhibition of Constitutive Nitric Oxide Synthase by L-p-Nitroarginine. *Biochemistry.* 32:8512-8517.
- Gainer J.V., Morrow J.D., Loveland A., King D.J., Brown N.J. (1998). Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med.* 339:1285-92.
- Gisbert R., Ziani, K., Miquel R., Noguera M.A., Ivorra M.D., Anselmi E., D'occon P. (2002). Pathological role of a constitutively active population of α_1D -adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 135, 206–216.

- Godínez-Hernández D., Gallardo-Ortiz I.A, López-Sánchez P., Villalobos-Molina R. (2006). Captopril therapy decreases both expression and function of α_1 D-adrenoceptors in prehypertensive rat aorta. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*. 26:21–29.
- Golias C.H., Charalabopoulos A., Stagikas D., Charalabopoulos K., Batistatou A. (2007). The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system – bradykinin. Review Article. *Hippokratia*. 11, 3: 124-128.
- Goligorsky M.S., Chen J., Brodsky S. (2001). Endothelial Cell Dysfunction Leading to Diabetic Nephropathy Focus on Nitric Oxide. *Hypertension*. 37:744-748.
- Gourine A.V. (2005). On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol*. 568:715-724
- Grigold D.E., Adams J.L. (1996). Constitutive cyclo-oxygenase (COX-1) and inducible cyclo-oxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date, *Medicinal research reviews*. 16:181-206.
- Gryglewski R.J., Botting R.M., Vane J.R. (1988). Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*. 12:530-548.
- Guyton A.C., Hall J.E. (1997). Unidad VI en Tratado de Fisiología Médica, 9° ed., Ed. Interamericana/McGraw-Hill, México, pp.124-130,276-286.
- Guyton A.C., Hall J.E. Unidad VI en Tratado de Fisiología Médica, 9° ed.1997, Ed.Interamericana/McGraw-Hill, México, pp.124-130,276-286.
- Hoffman B.B., Lefkowitz R.J. Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos y antagonistas de los receptores adrenérgicos. En Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA, Octava edición en español, McGraw-Hill Interamericana, pp. 211-264. 1996.
- Hu Z.W., Shi X.Y., Okazaki M., Hoffman B.B.. (1995). Angiotensin II induces transcription and expression of alpha-1 adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 268, H1006–1014.
- Hurairah, Ferro. (2004). The role of the endothelium in the control of vascular function. *Blackwell Publishing Ltd, Int J Clin Pract*. 582: 173-183.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987). Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and veins is nitric oxide: Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, 84:9265-9269.
- Jackson C.L., Schwartz S.M. (1992). Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension*. 20:713-736, 1992.
- Küng C.F., Moreau P., Takase H., Lüscher T.F. (1995). L-NAME Hypertension Alters Endothelial and Smooth Muscle Function in Rat Aorta. *Hypertension*: 26:744.
- Lefkowitz R.J, Hoffman B.B., Taylor P. Neurotransmisión: Sistema nervioso autónomo y motor somático. En Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica,

- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA, Octava edición en español, McGraw-Hill Interamericana, pp. 113-148. 1996.
- Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1988). Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *The journal of biological chemistry*. 263:4993-4996.
- Lefkowitz RJ, Hoffman BB, Taylor P. Neurotransmisión: Sistema nervioso autónomo y motor somático. En Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA, Octava edición en español, McGraw-Hill Interamericana, pp. 113-148, México, 1996.
- Linz W., Wiemer G., Gohlke P., Unger T., Scholkens B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev. Mar.* 47(1):25-49.
- Lüscher T.F., Seo B., Bühler F.R. (1993). Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension*. 21:752-757.
- Lüscher T.F., Vanhoutte P.M. (1991). The endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. *Boca Raton. Fla: CRC Press*. 1-228.
- Ma X., Chapeau M.W., Whiteis C.A., Abboud F.M., Bielefeldt K. (2001) Angiotensin selectively activates a subpopulation of postganglionic sympathetic neurons in mice. *Circ. Res.* 88:787-793.
- Madeddu, P., Parpaglia, M. P. Demontis, M. V. Varoni, M.C. Fattaccio, V. Anania, N. Glorioso. (1995). Early blockade of bradykinin B2-receptors alters the adult cardiovascular phenotype in rats. *Hypertension*. 25: 453-459.
- Majima M., Mizogami S., Kuribayashi Y., Katori M., Oh-ishi S. (1994). Hypertension induced by a nonpressor dose of angiotensin II in kininogen-deficient rats. *Hypertension*. 24: 111-119
- Marceau F. (1995). Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*. 30:1-26.
- Marín J. (1993). Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *Journal of autonomic pharmacology*. 13:127-176.
- Matsuda K., Sekiguchi F., Yamamoto K., Shimamura K., Sunano S. (2000). Unaltered endothelium-dependent modulation of contraction in the pulmonary artery of hypertensive rats. *European journal of pharmacology*. 392:61-70.
- Milia, A. F., Gross, V., Plehm, R., De Silva, J.A., Bader, M., Luft, F. C. (2001). Normal Blood Pressure and Renal Function in Mice Lacking the Bradykinin B2 Receptor. *Hypertension*. 37:1473-1479.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E. (1989). The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochemical society transactions*. 17:542-543.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1988). The discovery of nitric oxide as endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, 12:365-372.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. 43:109-141.

- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*, 43:109-141.
- Navar L.G. (1978). Renal autoregulation: Perspectives from whole kidney and single nephron studies. *Am J Physiol*. 234: F357-F370.
- Opie L.H, Paterson D.J. Blood pressure and peripheral circulation. In Heart Physiology, Edit. Cell to Circulation. Cuarta edición, 2004.
- Osugi S., Shimamura K., Sunano S. (1990). Decreased modulation by endothelium of noradrenaline-induced contractions in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 305:86-99.
- Oza, N. B. Danana, H. G. (1992). Kininogenase of the aortic wall in spontaneously hypertensive rats. *J.C. Pharmacology*. 20:9 S1:S3
- Regoli D., Rhaleb N.E., Drapeau G., Dion S. (1990). Kinin receptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 15, S30–S38.
- Ren Y., Garvin J., Carretero O.A. (2002). Mechanism involved in bradykini-induced efferent arteriole dilation. *Kidney International*. 62:544-549.
- Rhaleb N.E., Yang X., Nanba M., Shesely E.G., Carretero O.A. (2001). Effect of Chronic Blockade of the Kallikrein-Kinin System on the Development of Hypertension in Rats. *Hypertension*. 37:121-128
- Romen R.J., Kaldunski M.L., Scicli A.G., Carretero O.A. (1988). Influence of kinins and angiotensin II on the regulation of papillary blood flow. *Am J Physiol*. 255: F690–F698
- Ruiz, P., Basso, N., Cannata, M.A., Taquinl, A.C. (1990). The renin-angiotensin system in different stages of spontaneously hypertension in the rat (SHR). *Clin.Exp. Hypertension*. 12:63–81.
- Schelling P., Fischer H., Ganden D. (1991). Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?, *Journal of hypertension*. 9:3-15.
- Schiffrin E.L., Thome F.S., Genest J. (1984). Vascular angiotensin II receptors in SHR. *J Hypertension*, 6, 682–688.
- Schrör K. (1992). Prostaglandin D2 relaxes bovine coronary arteries by endothelium-dependent nitric oxide-mediated cGMP formation. *Circ. Res*. 71:1305-1313.
- Server W.B., Daniels-Server A.E. (1975). Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacological reviews*. 25:415-449.
- Shai S., Fishel R.S., Martin B.M., Berk B.C., Bernstein K.E. (1992). Bovine angiotensin converting enzyme cDNA cloning and regulation. Increased expression during endothelial cell growth arrest. *Circulation research*. 70:1274-1281.
- Strader C.D., Fong T.M., Tota M.R., Underwood D., Dixon R.A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annual review of biochemistry*. 63:101-132.
- Taddei S., Salvetti A. (1996). Pathogenetic factors in hypertension endothelial factors. *Clinical and experimental hypertension*. 18 (3&4):323-335.

- Takata Y., Kato H. (1996). Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life sciences*. 58:91-106.
- Tan Y., Hutchison F.N., Jaffa A.A. (2004). Mechanisms of angiotensin II-induced expression of B2 kinin receptors. *Am J Physiol Heart Circ*. 286: H926–H932.
- Taussing R., Gilman A. G. (1995). Mammalian membrane-bound adenylyl cylase. *The journal biological chemistry*. 270:1-4.
- Tippmer S., Quitterer U., Kolm V., Faussner A., Roscher A., Mostaf L., Muller-Esterl W., Haring H. (1994). Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta. *Eur J Biochem*. 225:297-304.
- Vane J.R., Anggard E.E., Botting R. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl Med*. 323 (1): 27-36.
- Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 38:97-120.
- Veglio F., Morra di Cella S., Schiavone D., Paglieri C., Rabbia F., Mulatero P., Chiandussi L. (2001). Peripheral adrenergic system and hypertension. *Clinical and experimental hypertension*. 23(1&2):3-14.
- Villalobos-Molina R., López-Guerrero J.J. , Ibarra M. (1999). Functional evidence of alpha 1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology*. 126:1534-1536.
- Wang Y., Marsden P. A. (1995). Nitric oxide synthases: Gene structure and regulation. *Advances in pharmacology*. 26:171-194.
- Wolf G., Ziyadeh F. (1997). The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am. J. Kidney Dis*. 29:153–163.
- Zicha J., Kunes J. (1999). Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol. Rev*. 79:1227–1282.

16.- ANEXOS

Anexo 1

Compuestos para preparación de solución Krebs-Henseleit.

COMPUESTO	PESO (g/L)
NaCl	6.09
Glucosa	1.05
NaHCO ₃	2.1
KCl	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.29
KH ₂ PO ₄	0.16
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.37
Ca·EDTA·Na	0.01