

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

***INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS***

**“PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN
ALTERACIONES RENALES Y MITOCONDRIALES EN LA
HIPERTENSIÓN ARTERIAL TEMPRANA”**

Tesis que presenta la

Q.F.B. Lilia López Castillo

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Directores de la Tesis:

D.C. Daniel Godínez Hernández
Laboratorio de Farmacología

D.C. Alfredo Saavedra Molina
Laboratorio de Bioquímica

Morelia, Michoacán.

Agosto de 2011.

ÍNDICE

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

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Presión arterial.....	1
2. Hipertensión arterial: definición y perspectiva actual.....	2
2.1. Órganos afectados por la hipertensión arterial.....	4
2.2. Tratamientos antihipertensivos.....	5
3. Anatomía y fisiología del riñón.....	6
3.1. Formación de la orina en el riñón.....	10
3.2. Presión de perfusión renal.....	11
4. Sistema Renina Angiotensina.....	12
4.1. Síntesis de angiotensina II.....	13
4.2. Mecanismos de acción de la angiotensina II.....	15
4.3. El receptor de la angiotensina II AT ₁	16
4.4. El receptor de la angiotensina II AT ₂	17
4.5. Inhibidores del sistema renina angiotensina.....	18

5. Regulación del tono vascular por angiotensina II y óxido nítrico.....	20
5.1. Movimiento del calcio.....	21
6. Efectos de la hipertensión arterial en mitocondrias renales.....	21
6.1. Componentes de la cadena respiratoria.....	22
6.2. Transporte de electrones.....	23
6.3. Mecanismo de bombeo de protones.....	25
6.4. Control de la respiración mitocondrial.....	27
6.5. Disfunción mitocondrial.....	28
7. Óxido nítrico.....	34
7.1. Óxido nítrico sintasa.....	34
7.2. Síntesis del óxido nítrico.....	35
7.3. El óxido nítrico en el riñón.....	35
7.4. Modelo de hipertensión con L-NAME.....	36

II. JUSTIFICACIÓN.....	38
-------------------------------	-----------

III. HIPÓTESIS.....	38
----------------------------	-----------

IV. OBJETIVO GENERAL.....	39
----------------------------------	-----------

V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
---------------------------------------	-----------

CAPÍTULO II

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
--------------------------------------	-----------

1. Estrategia experimental.....	40
2. Registro de la presión arterial.....	40
3. Determinación de los niveles de creatinina y urea.....	41
4. Histología renal.....	41
4.1. Preparación de los tejidos para microscopía óptica.....	41
4.2. Tren de tinción hematoxilina–eosina.....	42
5. Técnica de órgano aislado y perfundido.....	42

5.1. Curvas concentración-respuesta a la angiotensina II.....	43
6. Análisis por western blot del receptor AT₁.....	44
6.1. Homogenización.....	44
6.2. Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry.....	44
6.3. Electroforesis.....	45
6.4. Transferencias de las proteínas a una membrana de PVDF.....	45
6.5. Reacción quimioluminiscente.....	46
7. Análisis del consumo de oxígeno en mitocondrias.....	47
7.1. Aislado y purificado de las mitocondrias renales.....	47
7.2. Determinación de las mitocondrias por el método de Biuret.....	47
7.3. Análisis del consumo de oxígeno en el estado 3 y 4 de la cadena respiratoria.....	48
8. Determinación de óxido nítrico por el método de Griess.....	48
9. Análisis estadístico.....	49

CAPÍTULO III

VII. RESULTADOS.....	49
1. Peso de los animales.....	49
2. Registro de la presión arterial.....	51
2.1. Valores de presión arterial sistólica.....	51
3. Análisis de los marcadores de daño renal.....	52
3.1. Determinación de urea.....	53
3.2. Determinación de creatinina.....	54
4. Histología renal.....	55
4.1. Estructura glomerular a una amplitud de 10X.....	55
4.2. Estructura glomerular a una amplitud de 40X.....	56
5. Respuesta renal a la angiotensina II.....	57
5.1. Presión de perfusión renal.....	58

6. Expresión renal del receptor de la angiotensina II AT₁.....	59
6.1. Niveles de expresión del receptor AT ₁	60
7. Velocidad de respiración mitocondrial.....	61
7.1. Estado 3 de la cadena respiratoria.....	62
7.2. Estado 4 de la cadena respiratoria.....	63
7.3. Cociente respiratorio.....	64
8. Participación del óxido nítrico mitocondrial en riñón.....	64
8.1. Niveles de óxido nítrico mitocondrial.....	65

CAPÍTULO IV

VIII. DISCUSIÓN.....	66
1. Peso de las ratas.....	66
2. Presión arterial sistólica.....	66
3. Marcadores de daño renal.....	68
4. Histología renal.....	69
5. Respuesta renal a la angiotensina II.....	69
6. Expresión del receptor de la angiotensina II AT ₁	70
7. Estados respiratorios.....	71
8. Síntesis de óxido nítrico mitocondrial.....	71
IX. CONCLUSIÓN.....	72
X. REFERENCIAS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras principales del riñón.....	8
Figura 2. Tipos de neuronas.....	9
Figura 3. Vía clásica del sistema renina angiotensina.....	14
Figura 4. Estructura de la cadena respiratoria.....	22
Figura 5. Peso corporal de las ratas.....	50
Figura 6. Presión arterial sistólica.....	51
Figura 7. Determinación de urea.....	53
Figura 8. Determinación de creatinina.....	54
Figura 9. Estructura glomerular a una amplitud de 10X.....	55
Figura 10. Estructura glomerular a una amplitud de 40X.....	56
Figura 11. Presión de perfusión renal.....	58
Figura 12. Niveles de expresión del receptor AT ₁	60
Figura 13. Estado 3 de la cadena respiratoria.....	62
Figura 14. Estado 4 de la cadena respiratoria.....	63
Figura 15. Niveles de óxido nítrico mitocondrial.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial.....	2
Tabla 2. Funciones del riñón.....	7
Tabla 3. Clasificación de la respiración mitocondrial.....	27
Tabla 4. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	30
Tabla 5. Cociente respiratorio.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato Adenosina
Ang II	Angiotensina II
Ang I	Angiotensina I
ARA's	Antagonistas del receptor de la angiotensina II
AT ₁	Receptor de la angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor de la angiotensina II tipo 2
ATP	Trifosfato adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca ⁺	Calcio
CAT	Catalasa
CoQ	Ubiquinona o coenzima Q
CPP32	La caspasa 3
CR	Cociente respiratorio
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedades cardiovasculares
Eo	Potencial de oxidoreducción o potencial redox
ERC	Enfermedad renal crónica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FAD	Dinucleotido de flavina y adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
GC	Gasto cardíaco
GSH-Px	Peroxidasa de glutatión
HA	Hipertensión arterial
H-E	Hematoxilina-Eosina
H ⁻	Ion hidruro
H ⁺	Hidrogenión
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogeno
IEC's	Inhibidores de la ECA
IP ₂	Inositol-4,5-bifosfato
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
Kf glomerular	Cociente de ultrafiltración glomerular
L-NAME	Nω-Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro
MLV	Músculo liso vascular
NAD ⁺	Dinucleotido de nicotinamida y adenina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH ⁻	Hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PA	Presión arterial
PG12	Prostaciclina
PKC	Proteína cinasa C
PP	Presión perfusión
PVDF	Fluoruro de polivinildieno
RPT	Resistencias periféricas totales
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SOD	Dismutasa de superóxido
SRA	Sistema renina angiotensina
TFG	Tasa de filtración glomerular

RESUMEN

La hipertensión arterial (HA) tiene como órgano blanco al corazón, cerebro, riñón y la vasculatura, siendo las causas principales de mortalidad. Uno de los sistemas implicados en regular la presión arterial (PA) es el sistema renina angiotensina (SRA) renal, este controla la PA tanto a corto como a largo plazo. La angiotensina II (Ang II) al ser el mediador más importante de este sistema, tiene una participación importante en la homeostasis renal y cardiovascular, mediando sus efectos fisiológicos y fisiopatológicos a través de dos tipos de receptores específicos, principalmente por el receptor de la Ang II tipo 1 (AT_1). El objetivo del presente trabajo fue determinar la participación de la Ang II, en el riñón, en etapas tempranas de HA, para lo cual se evaluó en el riñón cambios en marcadores de daño renal, cambios estructurales, la respuesta renal a la Ang II, se determinó la presencia del receptor AT_1 , el consumo de oxígeno (O_2) en el estado 3 y 4 de las mitocondrias y los niveles de óxido nítrico (ON) mitocondrial. Se emplearon ratas Wistar de 200 a 250 g y se dividieron en 4 grupos: Control, HA (70 mg/kg/día L-NAME, durante 4 semanas), Captopril (35 mg/kg/día, durante 2 semanas) e HA/Captopril (se administraron ambas dosis, durante los mismos tiempos). Se midieron los niveles de urea y creatinina en suero mediante un método colorimétrico, se hicieron cortes histológicos y se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (E-H) en los riñones izquierdos, se corrieron curvas concentración-respuesta a la Ang II en los riñones derechos en un sistema de órgano aislado y perfundido tipo Langendorff, se determinó en homogenizado de riñón el receptor AT_1 por la técnica de Western Blot, con la ayuda de un oxímetro se midió el consumo de O_2 en el estado 3 y 4. Por último se midieron las concentraciones de ON mitocondrial mediante el método de Griess. La HA produjo un aumento significativo de la PA (Control: 120/80 Vs. L-NAME: 140/120 $p<0.05$), y el tratamiento con captopril restauró los valores de PA normales (HA/Captopril: 120 Vs. HA: 140 $p<0.05$). En los niveles de urea y creatinina no hubo cambios entre los grupos. La HA alteró la estructura glomerular provocando un daño en los glomérulos de un 30% y el tratamiento con captopril previno este cambio en el grupo de ratas HA/Captopril. La HA causó un incremento del 80% en la presión de perfusión (PP) renal dependiente de la concentración de Ang II y el captopril evitó el aumento en el grupo de ratas HA/Captopril. Sin embargo, el análisis del receptor AT_1 renal mostró que el grupo HA/Captopril mostró una disminución significativa con respecto al grupo de ratas Control ($p<0.05$) en la expresión de este receptor. En cuanto al consumo de O_2 en los estados 3 y 4, al realizar una integración de los datos se observó que la HA en los grupos HA e HA/Captopril produjo una disfunción mitocondrial que el tratamiento con captopril no previno. La síntesis de ON mitocondrial disminuyó en el grupo de ratas HA/Captopril con respecto al grupo de ratas Control ($p<0.05$) y al parecer también tiene un papel importante en la disfunción mitocondrial causada por la HA. Con estos resultados se sugiere que desde etapas tempranas de HA existen alteraciones renales importantes a nivel glomerular y una hipersensibilidad renal que como observamos no es a consecuencia de un aumento en la cantidad del receptor AT_1 sino quizás a una mayor afinidad de la Ang II a su receptor y a una mayor eficiencia en la amplificación de señales, además que estos daños en el riñón durante la HA son prevenidos con el tratamiento con captopril. Sin embargo, la disfunción mitocondrial causada por la HA no es prevenida por el tratamiento con captopril. En conclusión la Ang II participa en las alteraciones renales y mitocondriales en la HA temprana.

I. INTRODUCCIÓN

1. PRESIÓN ARTERIAL

Para que la sangre transporte los nutrientes necesarios para cada órgano se requiere de cierta presión, cuando los valores de PA normal disminuyen dan lugar a una hipotensión y cuando los valores de PA aumenta dan lugar a la HA.

La PA es la fuerza que ejerce la sangre en contra de cualquier unidad de área de la pared del vaso sanguíneo y resulta de multiplicar el gasto cardíaco por las resistencias periféricas totales ($PA = GC \times RPT$), no obstante, esta relación matemática es extremadamente compleja al aplicarse a un sistema biológico, ya que están involucrados una serie de mecanismos biológicos variados en su origen e interacción (Duarte y col., 2003).

La PA tiene dos componentes:

Presión arterial sistólica (PAS): corresponde al valor máximo de la tensión arterial en sístole (cuando el corazón se contrae). Se refiere al efecto de presión que ejerce la sangre eyectada del corazón sobre la pared de los vasos.

Presión arterial diastolita (PAD): corresponde al valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está en diástole o entre latidos cardíacos. Depende fundamentalmente de la resistencia vascular periférica. Se refiere al efecto de distensibilidad de la pared de las arterias, es decir el efecto de presión que ejerce la sangre sobre la pared del vaso.

2. HIPERTENSIÓN ARTERIAL: DEFINICIÓN Y PERSPECTIVA ACTUAL

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

La HA sistémica se define como un padecimiento crónico en el cual la característica principal es un aumento sostenido de la PA por encima de 140/90 mmHg (JNC-7, 2003) y en adultos, el riesgo de padecer una ECV y renal relacionada con esta enfermedad es lo bastante alto para ameritar atención médica (Hoffman, 2007). La HA es un desorden hemodinámico de las sustancias vasodilatadoras, de las vasoconstrictoras o ambas; que refleja un aumento en las resistencias vasculares periféricas (Sosa y col., 2005).

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

Tabla 1. Valores de presión arterial sistólica y diastólica considerados en la clasificación de presión arterial. Modificada de JNC-7, 2003.

En el 90 % de los casos de HA, la causa es desconocida, por lo cual, se le ha denominado HA esencial, con una fuerte influencia hereditaria. En 5 a 10 % de los casos, existe una causa directamente responsable de la elevación de la PA y a esta forma de HA se le denomina HA secundaria (Zenteno y col., 2003). Sin embargo, en todas las formas de HA, la RPT está aumentada por múltiples factores, entre los que se incluyen: disfunción endotelial, que se caracteriza por una disminución de la función y/o la producción de ON y prostaciclina (PGI_2), la elevación de los niveles plasmáticos de endotelina; la activación del SRA y un aumento de la Ang II circulante como agente vasoconstrictor; el incremento de catecolaminas y la viscosidad sanguínea; así como cambios estructurales de los vasos sanguíneos que consisten en la hipertrofia de la pared vascular y contribuyen a la disminución en el número y calibre de las células (Sosa y col., 2005).

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

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

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

2.1. ÓRGANOS AFECTADOS POR LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

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

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

Las enfermedades renales crónicas (ERC) representan un factor de riesgo para ECV independiente de los mencionados anteriormente (Elsayed y col., 2007) y en México, existe una prevalencia alta de ERC, siendo los principales factores de riesgo la diabetes y la obesidad (Paniagua y col., 2007).

Uno de los principales mecanismos fisiopatológicos involucrados en las complicaciones cardiovasculares de las enfermedades renales es la disfunción endotelial (Schiffrin y col., 2007) y se ha demostrado que la micro y macroalbuminuria son una expresión de la disfunción endotelial generalizada. La relación de enfermedades como la diabetes, la obesidad, la HA, así como la disfunción renal llevan a la activación del SRA, al aumento del estrés oxidativo, la inflamación de bajo grado con incremento en las citocinas circulantes y la dislipidemia. Todos estos mecanismos fisiopatológicos comunes están implicados en la asociación de insuficiencia renal y ECV (Schiffrin y col., 2007).

Las lesiones en órgano blanco de la HA pueden estar relacionadas con los siguientes problemas:

- Cardíaco: hipertrofia ventricular izquierda, angina o infarto miocardio previo, revascularización coronaria previa, insuficiencia cardíaca.
- Cerebral: evento cerebrovascular o ataque isquémico transitorio.
- ERC.
- Vasculopatía periférica.
- Retinopatía (Chobanian, 2003).

2.2. TRATAMIENTOS ANTIHIPERTENSIVOS

En este tipo de pacientes es más importante mantener un riguroso control de la PA. Se ha observado que el uso de fármacos antihipertensivos se obtiene una disminución significativa del 34 % en el riesgo de eventos cardiovasculares. Los antihipertensivos que producen este beneficio son: los diuréticos tiazida, antagonistas beta-adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio (Ca^{+}), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA's) y antagonistas del receptor AT_1 (ARA's) (Ross y col., 2003).

El uso de fármacos que intervienen en el SRA, como son: los IECA's, los ARA's e incluso los inhibidores de renina, otorgan un beneficio adicional, particularmente por su efecto renoprotector (Sowers, 2004). En este sentido, el tratamiento con captopril reduce significativamente la tasa de progresión de albuminuria (Deedwania, 2000).

La terapia con diversos ARA's, como el losartán, fue asociada con una reducción del 28% del riesgo de insuficiencia renal terminal (Sowers, 2004). La elevación de los niveles de bradicinina, asociada con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y la subsecuente producción estimulada de ON, PGI₂ y factor hiperpolarizante derivado del endotelio puede contribuir a los beneficios clínicos de los IECA's, en tanto los ARA's pueden proveer renoprotección y cardioprotección en estos pacientes, de manera similar que los provistos por los IECA's (Deedwania, 2000).

3. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL RIÑÓN

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

Las funciones del riñón son numerosas como las que se resumen en la **tabla 2** (Tomada de Guyton y Hall, 2006).

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

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

Tabla 2. Principales funciones del riñón.

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

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

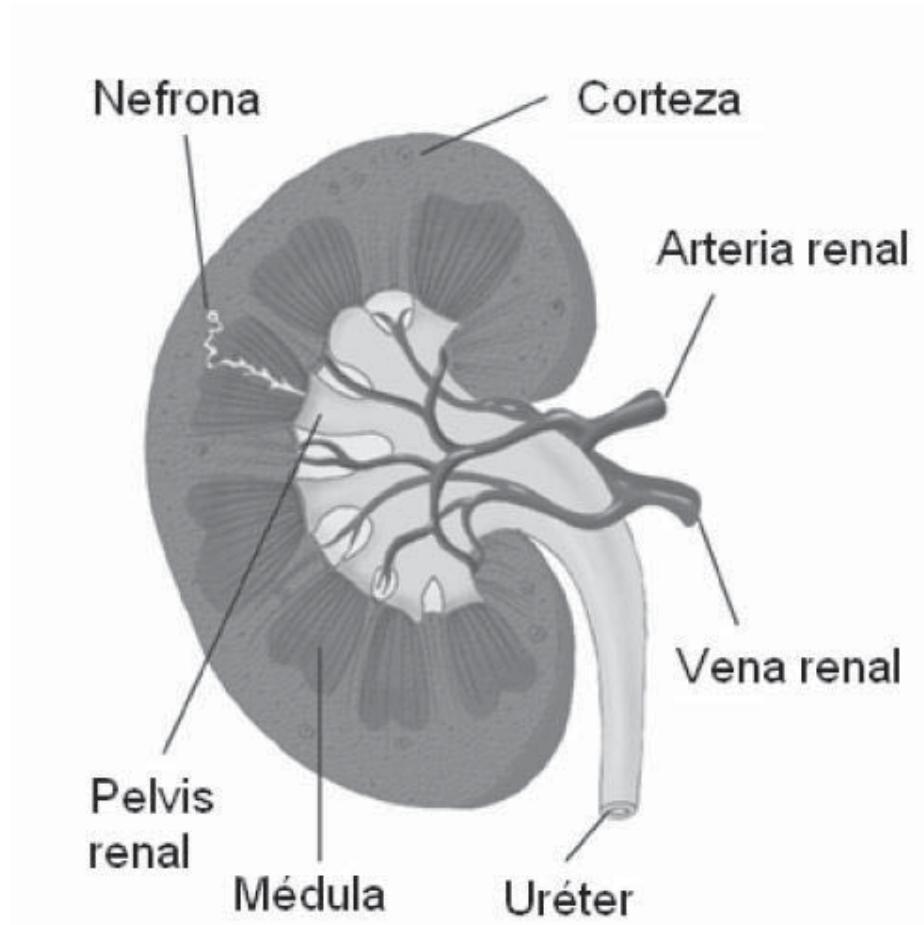


Figura 1. Corte longitudinal del riñón, se observan las estructuras principales del riñón: corteza, médula, arteria renal, vena renal, uréter y pelvis renal.

8

El riñón humano está formado por cerca de un millón de nefronas, que son la unidad básica formadora de orina de los riñones. El riñón no puede regenerar nefronas nuevas, por lo tanto, las lesiones o las enfermedades renales, o el envejecimiento normal, producen una pérdida progresiva del número de nefronas. Sin embargo, esta pérdida no encierra peligro para la vida por que los cambios adaptativos de las restantes nefronas les permiten excretar las cantidades adecuadas de agua (H_2O), electrolitos y productos de desecho.

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

8

realiza con base en la morfología de la cubierta de células epiteliales de los segmentos de la nefrona (Jackson, 2007).

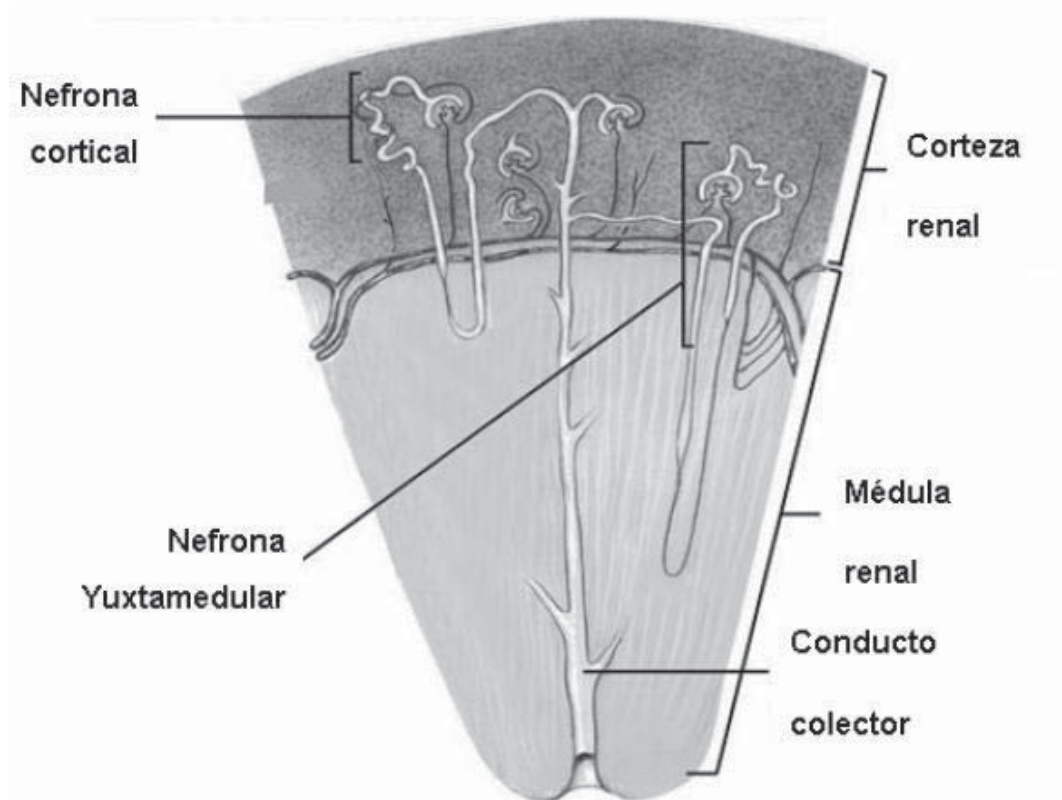


Figura 2. Esquema de las dos principales tipos de nefronas: cortical y yuxtamedular, ambas conectadas a los túbulos colectores de orina.

En estadios de HA la síntesis de Ang II se ve aumentada y la filtración glomerular se ve afectada debido a que, la Ang II es un agente vasoconstrictor potente en células del músculo liso vascular (MLV); estimula a las células de la zona glomérulos de la corteza adrenal para sintetizar y secretar aldosterona que, a su vez, aumenta la reabsorción de sodio y H_2O en el riñón. También produce polidipsia e incrementa la secreción de la hormona antidiurética, aumentando por ambos mecanismos los fluidos corporales (Weir y Dzau, 1999). Y si no se da un controla la HA puede llegar a dañar el riñón de manera irreversible.

3.1. FORMACIÓN DE ORINA EN EL RIÑÓN

En el ser humano, los dos riñones producen en conjunto alrededor de 120 ml de ultrafiltrado y, no obstante, solo se forma 1 ml/min de orina. En consecuencia, más del 99% del ultrafiltrado glomerular se reabsorbe con gran costo de energía. Los riñones consumen 7% de la captación total de O_2 del cuerpo a pesar de que estos órganos sólo constituyen 0.5% del peso corporal (Jackson, 2007).

La formación de la orina es el resultado de tres procesos principales: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular. La formación de orina comienza con la filtración de una gran cantidad de líquido que prácticamente carece de proteínas, desde los capilares glomerulares a la cápsula de Bowman. La mayoría de las sustancias del plasma, excepto las proteínas, se filtran libremente, de tal modo que sus concentraciones en el filtrado glomerular de la cápsula de Bowman son casi las mismas que en el plasma. Cuando el líquido filtrado sale de la cápsula de Bowman y pasa por los túbulos, su composición se va modificando debido a la reabsorción de H_2O y de determinados solutos, que son devueltos a la sangre o debido a la secreción de otras sustancias que pasan desde los capilares peritubulares al interior de los túbulos.

Cada sustancia del plasma tiene su propia combinación de filtración, reabsorción y secreción, antes de ser excretada. La tasa con la que una sustancia se excreta por la orina depende las tasas relativas de estos tres procesos renales básicos (Guyton y Hall, 2006).

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

3.2. PRESIÓN DE PERFUSIÓN RENAL

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

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

Comparado con la condición basal, en donde las resistencias arteriolares son las mismas, si se contrae la arteriola aferente, mientras la arteriola eferente se relaja, existe una disminución de la presión de los capilares glomerulares. Contrariamente, si se contrae la arteriola eferente, mientras se relaja la arteriola aferente, aumenta la presión de capilar glomerular.

De estas respuestas idealizadas, uno puede deducir que un aumento en la resistencia arteriolar aferente puede disminuir la tasa de filtración glomerular (TFG) y un incremento en la resistencia arteriolar eferente puede tener el efecto opuesto. Sin embargo, cuando existen cambios fisiológicos en la resistencia arteriolar aferente y eferente usualmente no se mantiene una resistencia arteriolar total constante. De esta manera, cambios en la resistencia arteriolar renal, generalmente lleva a cambios en el flujo plasmático glomerular, que puede influenciar la TFG independiente de la presión de capilar glomerular (Giebisch y col., 2005).

4. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

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

El SRA juega un papel muy importante en la regulación de la PA y el balance electrolítico. Debido a que el SRA se reconoce como un mecanismo para estimular la síntesis de aldosterona y secreción de la misma, y como un importante mecanismo fisiológico en la regulación homeostática de la PA y la composición de electrolitos de los líquidos corporales (Garrison y col., 1991).

El SRA se activa cuando hay una disminución de la PA por baja del volumen sanguíneo y/o de la concentración de sodio plasmático, principalmente. También lo activan la hipoperfusión de la corteza renal de cualquier etiología y la estimulación de los receptores adrenérgicos β_1 del aparato yuxtaglomerular (Cruz y col., 2004).

El SRA se activa cuando hay una disminución de la PA por baja del volumen sanguíneo y/o de la concentración de sodio plasmático, principalmente. También lo activan la hipoperfusión de la corteza renal de cualquier etiología y la estimulación de los receptores adrenérgicos β_1 del aparato yuxtaglomerular (Cruz y col., 2004).

4.1. SÍNTESIS DE ANGIOTENSINA II

En la **figura 3** se muestra a la renina, que es sintetizada, almacenada y secretada hacia la circulación arterial renal por las células granulares del aparato yuxtaglomerular.

Su secreción es controlada por dos vías intrarrenales y una extrarrenal. La vía intrarrenal de la mácula densa opera de acuerdo al flujo de NaCl. El aumento del flujo de este compuesto inhibe la liberación de renina y su disminución la estimula. La vía intrarrenal del barorreceptor funciona de acuerdo a los cambios de la presión sanguínea en los vasos preglomerulares, su aumento inhibe la liberación de renina y su baja la estimula. La vía extrarrenal del receptor β -adrenérgico es mediada por la liberación de noradrenalina desde las terminales nerviosas simpáticas postganglionares; la activación de los receptores adrenérgicos de las células yuxtaglomerulares aumenta la secreción de renina.

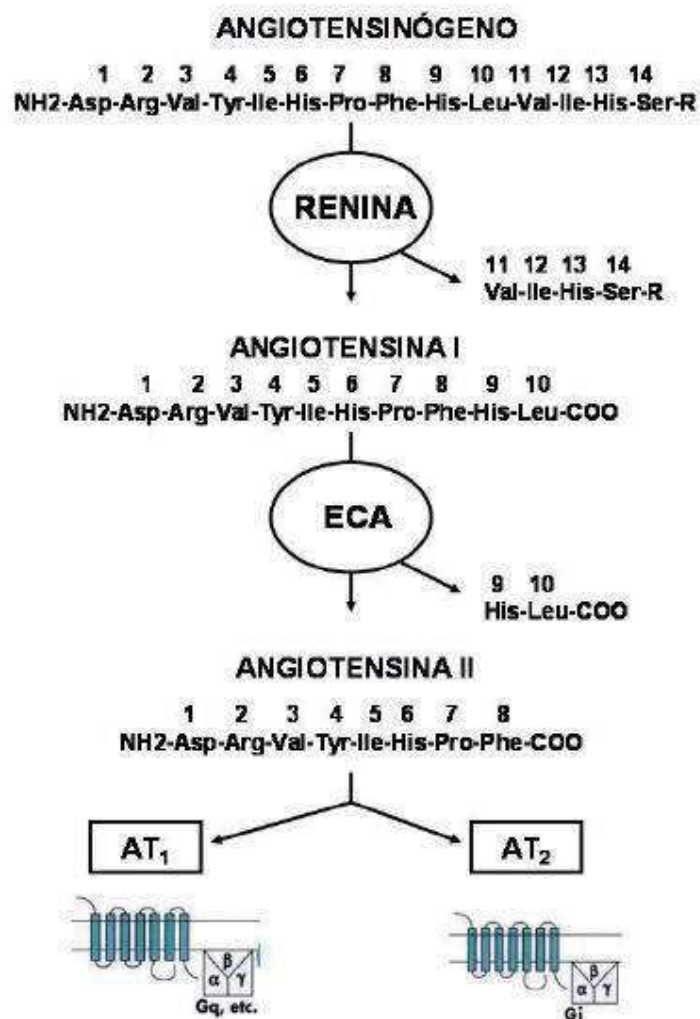


Figura 3. Vía clásica del sistema renina-angiotensina y formación de péptidos angiotensina. Las estructuras de las angiotensinas mostradas son las que se encuentran en seres humanos, caballos, ratas y cerdos. Se describe la secuencia N-terminal del angiotensinógeno humano. ECA, enzima convertidora de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

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

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

4.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA ANGIOTENSINA II

Una vez sintetizada la Ang II, esta media sus efectos al estimular dos tipos de receptores de la membrana plasmática, heptahelicoidales acoplados a proteína G, AT₁ y receptor de la Ang II tipo 2 (AT₂) (Touyz y col., 2000).

La estimulación de los receptores AT₁ genera activación por medio de la proteína G, de tipo G_{q/11}, que esta acoplada positivamente a la fosfolipasa C-β. Esta última es una enzima membranar que hidroliza al inositol-4,5-bifosfato (IP₂) para generar inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol.

El IP₃ se une a receptores específicos y promueve la liberación intracelular de Ca⁺, de las reservas de Ca⁺ sensibles de IP₃, este fenómeno junto con el diacilglicerol activa la proteína cinasa C (PKC), que entre otras cosas aumenta la entrada de Ca⁺ en la célula desde el exterior, debido a la abertura de los canales de Ca⁺ localizados en la membrana celular. El Ca⁺ se une a la calmodulina, y el complejo Ca⁺/calmodulina activa diversas enzimas intracelulares, como ATPasa y cinasas que contribuyen a la respuesta celular final (Flores y col., 1997).

La Ang II tiene diversas funciones tales como las siguientes:

a) INCREMENTA LA RPT:

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

b) REGULA LA FUNCIÓN RENAL:

- a) Reduce la excreción urinaria de sodio y H_2O e incrementa la excreción de potasio,
- b) Estimula la síntesis y secreción de aldosterona,
- c) Reduce el flujo sanguíneo renal mediante la constricción directa del MLV renal.

c) ALTERA LA ESTRUCTURA CARDIOVASCULAR:

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

4.3. EL RECEPTOR DE LA ANGIOTENSINA II AT_1

El receptor AT_1 pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G y que típicamente activan a la fosfolipasa C a través de la proteína heterotrimérica Gq/11 (Touyz y col., 2000). En el humano el gen del receptor AT_1 se encuentra en el cromosoma 3, y en la rata los genes de los receptores AT_{1a} y AT_{1b} se encuentran en los cromosomas 17 y 2, respectivamente (Kim y col., 2000).

El receptor AT_1 consta de 359 aminoácidos, casi todos los efectos biológicos conocidos de la Ang II son mediados por este receptor, es decir, la estimulación de este receptor produce una elevación de la PA, vasoconstricción, incremento en la contractilidad cardíaca, aumenta la liberación de aldosterona de las glándulas adrenales, facilita la liberación de catecolaminas de las terminales nerviosas, reabsorción de H_2O y sodio (Jackson, 2007). La distribución del receptor AT_1 es ubicua, encontrándose ampliamente en tejidos adultos, incluyendo vasos sanguíneos, corazón, riñón, glándulas adrenales, hígado, cerebro y pulmones (Kobori y col., 2000).

Además, existen reportes que soportan la idea de que la Ang II, a través del AT_1 , puede participar directamente en la patogénesis de diversas ECV y renales (Kim y col., 2000).

4.4 EL RECEPTOR DE LA ANGIOTENSINA II AT_2

La segunda isoforma principal de los receptores a la Ang II es el receptor AT_2 que está normalmente expresado en altas cantidades en tejidos fetales y disminuye rápidamente después del nacimiento (Touyz y col., 2000). En el adulto, la expresión de este receptor es limitada, encontrándose principalmente en útero, ovarios, ciertos núcleos del cerebro, corazón y médula adrenal (Kim y col., 2000). El receptor AT_2 consta de 363 aminoácidos; tiene poca homología en la secuencia de los aminoácidos (~32-34%) con el receptor AT_1 ; pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G. Aún no se definen bien las actividades funcionales de los receptores AT_2 , pero es posible que ejerzan un papel fisiológico antagónico al AT_1 , como efectos antiproliferativo, proapoptótico, vasodilatador y antihipertensivo (Matsubara, 1998).

4.5. INHIBIDORES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

La importancia del SRA en la patogénesis de la HA se soporta por el hecho de que el bloqueo del SRA con terapia génica (Phillips y col., 1997) o por intervenciones farmacológicas con IECA's o ARA's en el periodo crítico juvenil (Bergstrom y col., 2002) puede atenuar o prevenir el desarrollo de la HA.

Se han observado varios beneficios al utilizar inhibidores del SRA entre estos los efectos antihipertensivos, se han observado claros en la disminución de la PA hasta valores normales. Los inhibidores del SRA, como los IECA's o los ARA's, bajan la PA y protegen al riñón y al corazón de daños relacionados con la HA. Esta protección no solo se asocia con la disminución de la PA (Opie 2001). Si no también promueven la acumulación de bradicinina que estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial, consecuentemente incrementa la producción de ON endotelial (Hekimi y col., 2003). Además se han relacionado con cambios en la función mitocondrial asociados a cambios en el metabolismo del ON (Piotrkowski y col., 2009).

Los IECA's tienen efectos colaterales como tos seca (frecuente) y el angioedema (raro). Por tanto se creó una nueva estrategia para inhibir el SRA utilizando ARA's, como el losartán que interacciona con los aminoácidos en los dominios transmembranales de los receptores AT_1 y se acopla entre los espacios de las 7 hélices, lo cual evita la unión de la Ang II (Pocock y Richards, 2002).

Los IECA's son péptidos o derivados peptídicos, ampliamente utilizados para el tratamiento de la HA, la insuficiencia cardíaca congestiva, la disfunción del ventrículo izquierdo posterior a infarto al miocardio y en la miocarditis.

Así, como en enfermedades entre las que se encuentra la nefropatía diabética y la disfunción renal inducida por la HA. Su principal mecanismo de acción es inhibir el SRA, bloqueando el sitio activo de la enzima; de esta manera, inhibe su actividad en el proceso de transformación de Ang I a Ang II, por lo cual disminuye los niveles plasmáticos de Ang II y aldosterona y aumenta los de renina y Ang I. Los IECA's modifican el balance entre las propiedades vasoconstrictoras, la retención de sal y la activación de terminaciones simpáticas de la Ang II y las propiedades vasodilatadores y natriuréticas de la bradicinina; además, altera el metabolismo de muchas otras sustancias vasoactivas (Pocock y Richards, 2002).

Todos los IECA's se unen al ion zinc localizado en el sitio activo de la molécula de ECA y, de acuerdo con el ligando de zinc, se pueden clasificar en tres tipos:

1. Fármacos que contienen sulfidrilo, relacionados, desde el punto de vista estructural, con el captopril.
2. Compuestos que contienen dicarboxilo, relacionados en el aspecto estructural, con el enalapril.
3. Fármacos que contienen fósforo y muestran relación estructural con fosinopril.

El captopril suele preferirse como terapia inicial, en caso de pacientes con insuficiencia cardiaca severa e HA debido a su rápido comienzo de acción y duración de acción relativamente corta. El captopril es excretado principalmente a través del riñón y tiene potente interacción con los alimentos y es uno de los agentes que debe ser administrado separado de los alimentos (Pocock y Richards, 2002).

Los IECA's ocasionan disminución de la resistencia vascular sistémica y de las presiones arteriales media, diastólica y sistólica en diversos estados de HA lo cual proporciona gran utilidad clínica como antihipertensivo.

Debido a la gran sensibilidad de los vasos renales a los efectos vasoconstrictores de la Ang II. Este flujo sanguíneo renal aumentado no altera la TFG, aunque, en ocasiones, se puede estar reducida. Las arteriolas aferentes y eferentes se encuentran dilatadas. Existe conservación del flujo sanguíneo en los lechos vasculares cerebrales y coronarios, ya que existen potentes mecanismos autorreguladores (Pocock y Richards, 2002).

El tratamiento con IECA's induce protección renal debido a la reducción de la presión sanguínea sistémica, la presión intraglomerular y su efecto antiproliferativo, reducción de proteinuria y la disminución de los lípidos en pacientes con proteinuria (Pocock y Richards, 2002).

5. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR POR ANGIOTENSINA II Y ÓXIDO NÍTRICO

La Ang II al unirse a su receptor AT_1 activa la entrada de Ca^{+} al citoplasma y formar el complejo Ca^{+} /calmodulina para activar la cinasa de la cadena ligera de miosina y fosforilar la miosina y dar lugar a la contracción.

Por otra parte en ON generado en las células endoteliales activa a la proteína cinasa G va a propiciar la salida de Ca^{+} al exterior de la célula y activa a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina la cual va a desfosforilar a la miosina y a dar lugar a la relajación (Chen y col., 2003).

5.1. MOVIMIENTO DEL CALCIO

La liberación de Ca^{+} intracelular es el factor químico que induce la contracción. Durante la relajación muscular, la actividad de la ATPasa de Ca^{+} devuelve el Ca^{+} al interior de los sitios de almacenamiento de la célula disminuyendo las concentraciones de Ca^{+} en el citoplasma dando lugar a la relajación. Los cambios en las concentraciones de Ca^{+} en las células MLV mantienen el tono vascular las arterias. Durante la HA se altera la regulación del tono vascular produciéndose una disfunción endotelial causada por una deficiencia de ON y un aumento de Ang II, afectándose la regulación del tono vascular.

6. EFECTOS DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN MITOCONDRIAS RENALES

Recientes evidencias indican que la HA puede estar asociada con la disfunción mitocondrial relacionados con mecanismos involucrados en el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de SRA (Touyz, 2004). Por otro lado, existe una relación entre la síntesis de anión superóxido (O_2^{-}) y ON en la regulación de la función mitocondrial (Boveris y col., 2000). Debido a esta relación se ha observado que la función mitocondrial durante la HA se ve afectada debido a un aumento de la síntesis de O_2^{-} y una disminución de la síntesis de ON (Touyz 2004).

6.1. COMPONENTES DE LA CADENA RESPIRATORIA

La cadena de transporte de electrones se localiza en la membrana interna mitocondrial y está compuesta por cuatro complejos respiratorios denominados: I, II, III y IV. Estos complejos, además de estar formados por diferentes proteínas, contienen grupos prostéticos que, en conjunto, permiten el funcionamiento óptimo de cada uno de ellos (**figura 4**) (Pocock y Richards, 2002).

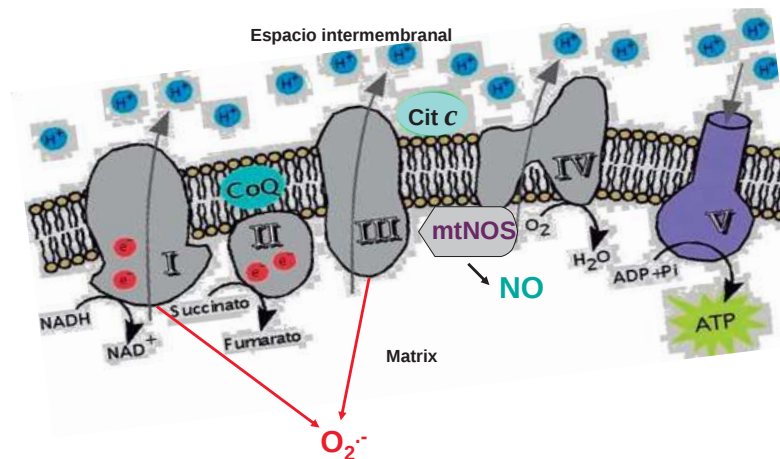


Figura 4. Cadena respiratoria.

Parte de la estructura del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) está conformada por una vitamina, la nicotinamida, que se ocupa de la captación del ion hidruro (H⁻) proveniente de sustratos como el malato, el isocitrato, el piruvato, el cetoglutarato alfa y los ácidos grasos, entre otros. Durante la reacción de deshidrogenación, la enzima correspondiente retira del sustrato un hidrogenión (H⁺) o protón o H⁺. El H⁻ se une al átomo de carbono 4 de la nicotinamida que tiene carga positiva y deja al NADH neutro. En el medio de reacción permanece el protón liberado. En la cadena de transporte de electrones, el NADH y el H⁺ son los sustratos iniciales, ya que el par de electrones debe introducirse con sus correspondientes protones.

Otro compuesto que funciona como grupo prostético en el complejo I de la cadena de transporte de electrones es el mononucleótido de flavina (FMN) que, unido a proteínas específicas, conforman las flavoproteínas. De la misma manera que NAD^+ , la FMN funciona con base en una vitamina la riboflavina. La única diferencia es que en la FMN se introducen en forma íntegra los dos hidrógenos (dos electrones y dos protones) extraídos del sustrato.

Dentro del mismo grupo de coenzimas ésta el dinucleótido de flavina y adenina (FAD), que actúa de la misma manera que el FMN, pero difiere de este último en que la riboflavina forma un dinucleótido con la adenosina. La ubiquinona o coenzima Q (CoQ) es una molécula hidrófoba que tiene la estructura general de las quinonas. La función de esta estructura es cambiar el estado de oxidación de sus oxígenos, lo que permite la incorporación de hidrógenos íntegros a su molécula.

Los citocromos son estructuras que tienen el hemo como grupo prostético, cuyo anillo básico es la protoporfirina IX. El porfirino, cuando se une a hierro, magnesio, o zinc forma lo que se denomina el grupo hemo, el cual se une a proteínas específicas y auxilia en el transporte de electrones, ya que estos se combinan con el metal del grupo hemo (Pocock y Richards, 2002).

6.2. TRANSPORTE DE ELECTRONES

En la mitocondria, los átomos de H^+ que se separan de los diversos sustratos debido a la acción de las deshidrogenasas que donan sus electrones a la cadena de transporte de electrones, la cual los transfiere al O_2 para producir H_2O . De acuerdo a la teoría quimiostática, parte de la energía liberada durante el transporte de electrones se almacena en forma de un gradiente de potencial electroquímico de protones, el cual se utiliza en la fosforilación oxidativa del adenosín bifosfato (ADP) en adenosín trifosfato (ATP) mediante la cooperación de la sintasa de ATP.

Este proceso se completa en la membrana interna de la mitocondria (Pocock y Richards, 2002).

Los electrones de NADH se transfieren a la deshidrogenasa de NADH, que contiene mononucleótidos de flavina y varios centros hierro-azufre como grupos prostéticos. Posteriormente, los electrones pasan a la ubiquinona que, a su vez, los dona al citocromo bc_1 . De aquí, viajan al citocromo c y al citocromo aa_3 (oxidasa de citocromo). Este último complejo utiliza cuatro electrones y cuatro protones para reducir el O_2 molecular a dos moléculas de H_2O . La rotenona, la antimicina A o el cianuro inhiben el transporte de electrones (Pocock y Richards, 2002).

La mitocondria, el orgánulo citoplasmático donde se lleva a cabo la mayor parte de la síntesis de ATP, está constituida por dos membranas una interna y otra externa. Entre ambas se localiza el espacio intramembranas y, limitada por la membrana interna, se encuentra la matriz.

La membrana interna mitocondrial que se estudia con más detalle debido a que en ella se encuentran las proteínas de la cadena respiratoria, la enzima que cataliza la síntesis del ATP y otras proteínas que funcionan como sistema de transporte. Se sabe que las enzimas de las membrana interna se encuentran organizadas en complejos multienzimáticos que se desplazan en el plano de la membrana.

Por razones funcionales, los componentes de la cadena respiratoria y el sistema de síntesis del ATP se encuentran orientados en forma vectorial a través de la membrana. Se sabe que tres complejos de la cadena respiratoria (I, III y IV), la sintasa ATP y la transhidrogenasa de nucleótidos de nicotinamida pueden generar un gradiente de protones y un potencial de membrana negativo en el interior. Por lo tanto, cada uno de estos sistemas se extiende de un lado a otro de la membrana interna.

El potencial de oxidoreduccion o potencial redox (E_o) determina la capacidad que tiene una molécula para aceptar o ceder electrones. Cuando los valores de este potencial son negativos, el compuesto tiende a ceder sus electrones con mayor facilidad, en tanto que potenciales positivos indican una mayor tendencia para captar electrones.

6.3. MECANISMO DE BOMBEO DE PROTONES

El complejo I u oxidorreductasa de ubiquinona: NADH también recibe el nombre de deshidrogenasa de NADH; es el primer componente de la cadena respiratoria y cataliza la siguiente reacción:



En donde Q se refiere a la ubiquinona, H^+_{N} a los protones que se tomaron del lado negativo de la membrana (matriz) y H^+_{P} a los protones que se transportaron al lado positivo de la membrana (espacio intermembranas). Por tanto el complejo I tiene la función específica de transportar electrones del NADH a la coenzima Q y bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranas.

El complejo II o deshidrogenasa de succinato cataliza la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs y dona los electrones a la ubiquinona en la membrana. La función de este complejo es transportar electrones del succinato a la coenzima Q.

El complejo II existe un acomodo de los grupos redox similar al descrito para el complejo I. En primer término, la deshidrogenasa de succinato tiene unido de modo covalente al FAD, el cual funciona como el aceptor inicial de los electrones del succinato. De aquí, los electrones transcurren de los tres centros hierro-azufre S1, S2, S3 hasta llegar a la quinona.

El complejo III o citocromo bc₁ cataliza la transferencia de dos electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo c, como se ve en la siguiente ecuación:



El ciclo Q es la oxidación de una molécula de ubiquinol, la reducción de dos moléculas de citocromo c, la aparición de cuatro H⁺ en el lado positivo de la membrana y la desaparición de dos H⁺ del lado negativo.

La oxidasa de citocromo c o complejo IV cataliza la transferencia de los electrones al O₂ según la siguiente reacción:



En condiciones fisiológicas, la sintasa de ATP cataliza la síntesis de ATP en un proceso que se adecua a la disipación del gradiente electroquímico de protones. La reacción se describe a continuación:



La sintasa de ATP es un transductor de energía que convierte la fuerza protonmotriz del gradiente de potencial electroquímico de protones en un par de torsión que se utiliza para favorecer la unión del fosfato con la enzima y la liberación del ATP del sitio activo.

6.4. CONTROL DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

La respiración es un proceso que se lleva a cabo en la cadena respiratoria de la mitocondria, y consiste en el consumo de O_2 debido al transporte de electrones desde las moléculas reducidas del tipo del NADH y del $FADH_2$ hasta el aceptor final que es el O_2 . Los productos finales de la respiración son el H_2O y un gradiente electroquímico de protones, que se utiliza para la síntesis de ATP. De acuerdo con las diferentes condiciones experimentales a las que se exponen las mitocondrias, la respiración mitocondrial se clasifica en varias etapas, las cuales se describen en el siguiente cuadro:

Estado	Sustrato	O_2	ADP	Velocidad de respiración	Factor limitante
1	Bajo	+	Bajo	Lenta	ADP
2	0	+	Alto	Lenta	Sustrato
3	Alto	+	Alto	Rápida	Cadena respiratoria
4	Alto	+	Bajo	Lenta	ADP
5	Alto	0	Alto	0	O_2

Tabla 3. Clasificación de la respiración mitocondrial.

La presencia de ADP en el medio estimula el consumo de O_2 (estado 3 de la respiración), lo cual se debe al colapso del gradiente de protones como resultado del uso del ADP en la síntesis de ATP. La estimulación del consumo de O_2 termina cuando el ADP se transforma en ATP. Estos resultados indican que el ADP regula a la actividad de la cadena de transporte de electrones. Una vez que el ADP se transforma en ATP, la cadena de transporte de electrones vuelve a su estado basal (estado 4 de la respiración), en el que se observa un uso lento del O_2 .

La relación entre los estados 3 y 4 se denomina control respiratorio, y es un dato que refleja la integridad de las mitocondrias y el estado de acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP). Existe la convención de considerar que las mitocondrias íntegras deben tener un valor mínimo de 4 para el control respiratorio; sin embargo, es posible que este valor varíe en las mitocondrias de los diferentes tejidos. La idea del acoplamiento se basa en la prueba de que la cadena de transporte de electrones está en íntima conexión con la síntesis de ATP, y solo dicha síntesis puede estimular la respiración en condiciones normales. Como se mencionó, la membrana interna mitocondrial es impermeable a los protones, por lo que estos solo entran a la mitocondria por medio de la sintasa de ATP, con lo que se induce la síntesis de ATP. Cualquier fenómeno que permita la entrada de protones por otro medio que no sea el señalado causa un estímulo anormal de la velocidad de transporte de electrones, debido a la disipación del gradiente de protones, sin que haya síntesis de ATP.

La respiración mitocondrial acoplada a la síntesis de ATP no sólo puede desacoplarse, sino también inhibirse. Existen varios inhibidores de la cadena de transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. La presencia de cualquiera de estos inhibidores impide la producción de ATP, lo que deja a todos o algunos de los integrantes de la cadena respiratoria reducidos de manera parcial o total.

6.5. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Hay evidencias que indican que las disfunciones mitocondriales son la causa de varios tipos de degeneración neuronal. Es decir, como la disfunción mitocondrial induce una producción de ATP inadecuada, impide la amortiguación del Ca^{+} celular, activa proteasas y lipasas, a la sintasa del ON e induce la generación de radicales libres, la célula puede llegar a la apoptosis o muerte necrótica celular, según el daño.

La apoptosis es uno de los caminos de muerte que sigue la célula, de hecho, se le llama muerte programada. En este proceso, la mitocondria desempeña un papel fundamental. Uno de los primeros fenómenos de la apoptosis es el colapso del potencial de la membrana mitocondrial, lo que ocasiona una transición de permeabilidad y la liberación del citocromo. La pérdida de este potencial se relaciona con la irreversibilidad del proceso apoptótico. Asimismo, la transición de permeabilidad es un fenómeno complejo con el que se relacionan varias proteínas, como la hexocinasa, los receptores periféricos a benzodiazepinas, la porina, el canal aniónico dependiente de voltaje, la cinasa de creatina, el translocador de los nucleótidos de adenina y la ciclofilina D, una proteína de la matriz mitocondrial. También se ha sugerido que participan de transportador de la membrana interna y de la membrana externa y el complejo Bcl2, una proteína que protege contra la muerte programada.

Al favorecer la transición de permeabilidad se produce un poro que permite la difusión de solutos con un peso molecular menor de 1500 Da y se colapsa el potencial de la membrana. Esto impide que las proteínas mitocondriales que se sintetizan en el citosol se incorporen a la mitocondria, ya que este proceso requiere la energía acumulada en el potencial de la membrana. Además, se liberan el Ca^{+} y el glutatión de la matriz mitocondrial, se desajusta la respiración y se detiene la síntesis de ATP. Asimismo, la formación de este poro permite que se liberen proteínas mitocondriales, entre ellas el citocromo c. Su precursor, el holocitocromo c (apocitocromo c + el grupo hemo) interactúa con varios factores citosólicos para activar una proteasa de cisteína, la caspasa 3 (CPP32). A su vez, el CPP32 estimula al factor que fracciona al DNA, lo que conduce a una activación de las nucleadas que terminan por destruir al núcleo. Por otro lado, el citocromo c que proviene de la mitocondria libera el factor inductor de la apoptosis. En resumen, la mitocondria es fundamental en la muerte celular programada. Casi todos los radicales libres son muy inestables y no alcanzan estabilidad hasta que su electrón no forma un par. Por tal razón, sus vidas medias son extremadamente cortas (millonésima de segundo) y su característica es ser muy reactivos.

Radicales libres derivados de O_2 : Esta categoría abarca los radicales más importantes en situaciones biológicas, tanto por su reactividad como por la variedad de fenómenos donde se pueden identificar. Es importante considerar también aquí a ciertos compuestos, no radicales, que pueden funcionar como agentes oxidantes, dado que se convierten con facilidad en radicales. Todas estas formas moleculares reciben el nombre de ERO.

Radicales libres derivados de nitrógeno.- Esta categoría consta principalmente de ON y dióxido de nitrógeno. También existen moléculas no radicales que pueden dar origen a radicales libres centrados en el nitrógeno, o bien que resultan de las reacciones de los primeros con otras moléculas. Todas estas especies se designan con el término especies reactivas de nitrógeno (ERN).

ERO				ERN			
Radicales		No radicales		Radicales		No radicales	
Anión superóxido	O_2^-	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Óxido nítrico	NO	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Hidroxilo	OH^-	Ozono	O_3	Dióxido de nitrógeno	NO_2^-	Ácido nitroso	HNO_2
Peroxilo	RO_2^-	Ácido hipocloroso	HOCl			Ácido peroxinitroso	$ONOOH$
Alcoxilo	RO^-					Peroxinitrito alquilo	$ROONO$
Hidroperóxido	HO_2^-						

Tabla 4. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

O_2^- : Es un radical con carga negativa por que posee un electrón adicional. Se forma cuando el O_2 capta un electrón, es decir, se reduce. Se presenta con el punto que determina su comportamiento como radical y con el signo negativo que establece su carácter aniónico.

Radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$).- Es la especie de O_2 más reactiva y tiene una vida media aproximadamente de 10^{-9} segundos. La alta reactividad de este radical requiere una reacción inmediata en el lugar donde se genera.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).- Resulta de la reducción completa del $\text{O}_2^\cdot$. en realidad no es un radical, dado que no posee electrones desemparejados. Sin embargo, es importante ya que puede dar lugar a la formación del radical de $\text{OH}^\cdot$.

El metabolismo intermedio de la cadena respiratoria es una fuente biológica donde se lleva a cabo la generación de oxidantes.

El transporte de electrones en la mitocondria, aunque es muy eficiente, es imperfecto. Alrededor del 98% de los electrones transferidos origina la reducción completa del O_2 para formar H_2O .

Sin embargo, de 1 a 2% de los átomos de O_2 que entran a la cadena respiratoria quedan en un estado de reducción intermedio, con lo cual generan algún tipo de ERO formadas son $\text{O}_2^\cdot$, H_2O_2 y $\text{OH}^\cdot$.

Para mantener un equilibrio celular existen sistemas antioxidantes de defensa dentro de los cuales están los antioxidantes endógenos como:

Enzimáticas.-

Dismutasa de superóxido (SOD) más que una enzima se trata de una familia de isoenzimas. Éstas catalizan la dismutación del $\text{O}_2^\cdot$ para obtener O_2 y H_2O_2 . En el ser humano existe tres isoformas del SOD:

- SOD-Zn²⁺/Cu²⁺ (la cual se localiza en el citoplasma)
- SOD-Mn³⁺ (encontrada tanto en la matriz mitocondrial como en algunas bacterias)
- SOD-extracelular (que es secretada hacia el líquido extracelular, así como al plasma sanguíneo)

Catalasa (CAT) se localiza en los peroxisomas de las células de la mayoría de los mamíferos. Cataliza la conversión de dos moléculas de H₂O₂ en dos moléculas de H₂O y una de O₂; de esta manera previene la formación de radicales OH⁻ a través de un mecanismo de tipo Fenton. Se puede decir que trabaja sucesivamente con la SOD, ya que el producto de esta es el sustrato de la catalasa.

Peroxidasa de glutatión (GSH-Px) Es una selenoproteína citosólica que cataliza la reducción de H₂O₂ en dos moléculas de H₂O; utiliza para tal efecto electrones de hidrogeno que dona el tripéptido glutatión.

Niveles de defensa antioxidante

Los sistemas de defensa antioxidante trabajan de manera estructurada, organizados en diferentes niveles, y participan como un mecanismo protector contra los efectos de los radicales libres en función del grado de agresividad de éstos.

- El primer nivel consiste en el sistema de la oxidasa de citocromo, que da origen a más del 90% de la reducción del O₂ para convertirse en H₂O en el organismo. Este sistema evita la reducción univalente del O₂ mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar a los intermediarios.

- El segundo nivel consta de la presencia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ para dar O_2 y H_2O_2 como isoformas de SOD. Dos enzimas especializadas en evitar la formación de radicales $OH^{\cdot}$ a partir de H_2O_2 conforman el tercer nivel; estas enzimas son la CAT y la GSH-Px. En el cuarto nivel, las vitaminas antioxidantes E y C, o el caroteno beta o todos neutralizan a los radicales $O_2^{\cdot -}$ y $OH^{\cdot}$. Estas sustancias son reconocidas como excelentes antioxidantes intracelulares, tanto en la membrana como en el citosol.

La mayor parte de las moléculas en el organismo se recambian y se les reemplaza con regularidad una vez que se produjo algún tipo de daño molecular, por lo que el quinto nivel de defensa lo constituye el ciclo de degradación y resíntesis de cada tipo de biomolécula. En el caso del material genético, el cual tiende a ser molecularmente estable, los radicales libres pueden producir mutaciones en la doble del DNA, pero existen mecanismos de reparación que permiten mantener la estabilidad de la información genética (Pocock y Richards, 2002).

Durante la HA se ha demostrado que hay una disfunción mitocondrial causada por un desacoplamiento dentro de la cadena respiratoria. Existen diversas maneras de medir en grado de desacoplamiento de la cadena respiratoria una de estas es midiendo el consumo de O_2 en el estado 3 y 4, y haciendo un cociente respiratorio (CR) entre estos 2 estados respiratorios. Así como medir la síntesis de ON que entre el complejo 3 y 4 a partir de la enzima NOS mitocondrial se va estar sintetizando, el cual va a regular el consumo de O_2 en el complejo 4 al competir por el lugar con el O_2 .

7. ÓXIDO NÍTRICO

El ON fue descrito en 1980, donde se demostró la capacidad de las células endoteliales para liberar un factor relajante potente, difusible, que causa vasorrelajación en anillos aórticos de conejo *in vitro*. El ON es un factor paracrino/autocrino, importante en la regulación fisiológica de numerosos procesos biológicos incluyendo neurotransmisión, control cardiovascular, crecimiento celular, apoptosis e inflamación (Mattson y col., 2007).

El endotelio es la capa interna biológicamente activa de los vasos sanguíneos (Schalkwijk y col., 2005), desempeña una participación clave en la modulación del tono vascular, a través de la producción y liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Taddei y col., 1998).

El ON controla el tono vascular dependiente del endotelio y desempeña una función activa en numerosos procesos biológicos como la vasodilatación, la defensa contra infecciones o agresiones ambientales, la plasticidad de la sinapsis y ser una señal positiva en la activación del sistema inmunológico y la regulación del consumo de O₂ dentro de la cadena respiratoria mitocondrial.

7.1. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

El ON se sintetiza en diversas células, además de las endoteliales, a partir del aminoácido L-arginina por cuatro isoformas de la NOS. Estas enzimas son citosólicas y las expresan genes diferentes, dos son dependientes de la Ca⁺/calmodulina, una es inducible por citocinas y otra se localiza en las mitocondrias. Dichas isoformas son: la NOS endotelial, la NOS inducible, la NOS neuronal y la NOS mitocondrial (Ghafourifar y col., 2007).

7.2. SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

Estas enzimas catalizan la oxidación sucesiva de alguno de los dos residuos amino guanidino de la L-arginina para formar dos intermediarios inestables, la NG-hidroxi-L-arginina y posteriormente la NG-oxo-L-arginina de mayor estado de oxidación. De esta última se libera ON y L-citrulina, por un reacomodo intramolecular (Moncada y col., 1989).

7.3. EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL RIÑÓN

Las NOS se expresan ampliamente a lo largo de la vasculatura renal y la nefrona. Las cuatro isoformas principales están presentes en un número de segmentos vasculares y tubulares diferentes. La participación del ON en el control de la función renal se ha estudiado extensamente (Ishii y col., 2001).

A la fecha, hay estudios que indican que bajo condiciones fisiológicas el ON regula las resistencias vasculares renales, participa en el control de la hemodinámica renal y glomerular, activa el circuito de retroalimentación tubuloglomerular, aumenta la liberación de renina y transmisores simpáticos, regula el transporte tubular de iones y excreción renal de H₂O y sodio. De esta manera el ON intrarrenal contribuye a la regulación a largo plazo de la PA (Mattson y col., 2007).

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

Es ampliamente aceptado que el ON es un importante factor antihipertensivo endógeno que desempeña una participación significativa en el control de fluidos, la homeostasis de electrolitos y la regulación de la PA.

Una disfunción en las NOS en muchos tejidos se ha observado en ratas genéticamente hipertensas o también en ratas Dahl sensibles a sal. Además, la delección génica de la NOS endotelial se asocia con el desarrollo de HA en ratones. A pesar de los datos substanciales que demuestran la importancia del ON en el desarrollo de la HA, el mecanismo del efecto antihipertensivo mediado por ON está sujeto a debate.

7.4. MODELO DE HIPERTENSIÓN CON L-NAME

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

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

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

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

II. JUSTIFICACIÓN

-En la hipertensión arterial el sistema renina angiotensina se encuentra sobreactivado.

-Los inhibidores del sistema renina angiotensina disminuyen la presión arterial y aumentan la actividad de la óxido nítrico sintasa.

-En la hipertensión arterial hay una deficiencia de óxido nítrico.

-La angiotensina II estimula la síntesis de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Sin embargo, no se conoce de qué manera la angiotensina II contribuye a los cambios renales y mitocondriales en un periodo corto de hipertensión arterial.

III. HIPÓTESIS

En el riñón, la angiotensina II contribuye a las alteraciones funcionales y mitocondriales en la hipertensión arterial temprana.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de la angiotensina II sobre la función del riñón y de las mitocondrias renales en la hipertensión arterial temprana.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar el efecto de la angiotensina II sobre el riñón en ratas hipertensas.
- 2.- Determinar el efecto de la angiotensina II sobre la función de las mitocondrias renales en ratas hipertensas.
- 3.- Evaluar la participación de la angiotensina II sobre la síntesis de óxido nítrico mitocondrial.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200 a 250 g de peso y se dividieron en 4 grupos: Control, HA, Captopril e HA/Captopril. Todos los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética Institucional y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, México). Durante el tratamiento, a los animales de todos los grupos se les midió la ingesta de H₂O y el peso corporal para ajustar la dosis de los fármacos administrados.

Al grupo de ratas Control sólo se les dió el H₂O. Para la inducción de la HA se administró una dosis de 70 mg/Kg/día del fármaco clorohidrato de N ω -Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; un inhibidor no selectivo de las NOS; Sigma, S.A) (Zatz *et al.*, 1998) disuelto en el H₂O de beber en el grupo HA e HA/Captopril por 4 semanas, y al grupo de ratas Captopril e HA/Captopril se administró una dosis de 35 mg/Kg/día del fármaco captopril (un inhibidor de la ECA), en el H₂O de beber durante las últimas 2 semanas de tratamiento.

2. REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La PA se tomó en la arteria caudal de la rata con un método no invasivo (pletismógrafo LE 5007, Letica, PanLab, Barcelona España); se registró una medición basal al día cero, otra a las 2 semanas de tratamiento y una última medición antes del sacrificio del animal. Las ratas que tuvieron valores de PAS de arriba de 140 mmHg se consideraron ratas HA.

3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CREATININA Y UREA

Se obtuvieron muestras de sangre de la aorta abdominal de cada grupo de ratas. Las muestras se centrifugaron y se obtuvieron muestras de suero las cuales mediante un método colorimétrico se determinaron los valores de urea y creatinina.

Para la urea el suero se puso a reaccionar con o-ftalaldehído produciendo una sustancia colorida llamada isoindolina.

Para la creatinina el suero se puso a reaccionar con picrato alcalino produciendo un complejo rojizo.

Se realizó la lectura a 520 nm en un espectrofotómetro. La curva de calibración se hizo en Excel (Microsoft Office) y por interpolación se estimó la concentración de NO_3^- y NO_2^- en las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

4. HISTOLOGÍA RENAL

4.1. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Las ratas se sometieron a anestesia profunda con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), después se procedió a aislar y disecar el riñón izquierdo de los animales de todos los grupos experimentales, se fijaron los riñones con formalina 4%, para detener los procesos celulares dinámicos.

Se pasaron los riñones en varias soluciones (H₂O corriente, OH 50%, OH 60%, OH 70%, OH 75%, OH 80%, OH 85%, OH 90%, OH 96%, OH 100%, OH 100%, OH amílico, OH amílico, durante 20 minutos entre cada una). Se realizó una inclusión en parafina líquida durante 48 horas. Posteriormente se dejó enfriar, se solidifica la parafina y se forma junto con el tejido incluido un bloque sólido o "taco" que es lo que se secciona, el tejido se corta a 5 µm en un microtomo y se coloca en un portaobjeto.

4.2. TREN DE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Posteriormente, los cortes se metieron a otro tren para desparafinar e iniciar con la tinción (xilol I (5 minutos), xilol II (5 minutos), xilol-OH (3 minutos), OH-100% (3 minutos), OH-90% (3 minutos), OH-80% (3 minutos), OH-70% (3 minutos), H₂O (5 minutos), hematoxilina (1 minuto), H₂O (1 minuto), eosina (5 minutos), OH-70% (1 minutos), OH-80% (2 minutos), OH-90% (3 minutos), OH-100% (5 minutos), xilol I (3 minutos), xilol II (5 minutos)).

Por último se tomaron fotografías en un microscopio óptico (VE-BC1) de los glomérulos a diferentes amplitudes en todas las muestras de los 4 grupos de ratas.

5. TÉCNICA DE ÓRGANO AISLADO Y PREFUNDIDO

Las ratas se sometieron a anestesia profunda con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), después se procedió a aislar y disecar el riñón derecho de los animales de todos los grupos experimentales, utilizando la metodología de riñón aislado y perfundido y un sistema de adquisición de datos (Biopac System Inc., CA, USA) para construir curvas concentración-respuesta a la Ang II.

Primeramente, se realizó una laparotomía, incidiendo plano por plano hasta llegar al peritoneo y exponer el riñón derecho, éste se descapsuló para eliminar las glándulas suprarrenales y el posible efecto de las hormonas liberadas por ellas. En el riñón derecho de los animales de todos los grupos experimentales; Control, HA, Captopril, y HA/Captopril se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ang II ($1 \times 10^{-7.5}$ - $1 \times 10^{-3.5}$ M) para registrar la PP dependiente de la concentración en el tejido estudiado.

Los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich: la Ang II y las sales de la solución Krebs-Henseleit (NaCl, KCl, CaCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, EDTA, glucosa). Todos los reactivos se disolvieron en H₂O destilada y las diluciones fueron preparadas diariamente.

5.1. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II

Los riñones derechos aislados se canularon a través de la arteria mesentérica superior hasta llegar a la arteria renal. Una vez aislado el riñón, a través de la cánula se conectó a un flujo constante de solución Krebs-Henseleit a 10 ml/min, con la siguiente composición (en mM); NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl, 2.52; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.75; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.027 y glucosa 11.6; con un pH de 7.4; 37° C y burbujeo constante de carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) y se montó en un sistema de órgano aislado y perfundido tipo Langendorff.

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

Una vez montados los riñones se hizo una sensibilización del tejido.

Posterior a la sensibilización del tejido, se realizó la primera curva concentración-respuesta administrando 10 µl de Ang II, en el rango de concentraciones de $1 \times 10^{-7.5}$ - $1 \times 10^{-3.5}$ M, seguido de la recuperación del tejido por 1 hora.

6. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DEL RECEPTOR AT₁

6.1. HOMOGENIZACIÓN

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

6.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

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

6.3. ELECTROFORESIS

Se agregó 10% de buffer de carga Laemlli (0.125 M Tris HCl pH 6.8, SDS 0.35 M, Glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.03 mM). Las muestras se hirvieron, 10 minutos, a 100° C, para desnaturalizar a las proteínas.

Se prepararon geles SDS-PAGE al 10%, cargando 50 µg de proteína, de cada una de las muestras en pozos diferentes, en el pozo número 1 se cargaron 3 µl de marcador de peso molecular (AMRESCO® protein marker Wide range). La electroforesis se llevó a cabo, durante 2 horas a 110 V, por medio de la aplicación de un campo eléctrico para separar las proteínas en función de su masa molecular.

6.4. TRANSFERENCIA DE LA PROTEÍNA A UNA MEMBRANA DE FLUORURO DE POLIVINIL DIENO (PVDF)

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a la membrana de PVDF (Amersham Biosciences), utilizando buffer de transferencia (Trizma Base, Glicina, Metanol 10%, SDS 10%). La electrotransferencia se hizo en condición semiseca empleando un TRANS-BLOT (Bio-Rad), durante 45 minutos a 15 V.

Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron incubadas durante 2 horas, con agitación constante en TBS-tween con leche baja en grasas para el bloqueo de los sitios inespecíficos (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, tween 20, 0.05% y leche 5%), a temperatura ambiente.

Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra, dirigido contra el carboxilo terminal del receptor AT₁ o contra α -actina (de peso molecular aproximado de 40 y 45 kDa, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology) ambos a una dilución 1:500, en TBST-5% leche a 4° C durante toda la noche y con agitación constante. Luego la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween, para después incubar por 2 horas con el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-cabra Anti IgG (acoplado a la enzima peroxidasa; Zymed®) en TBS-tween leche, a la dilución 1:1000, en agitación constante durante 2 horas, a temperatura ambiente.

Pasando este tiempo la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween, en agitación constante a temperatura ambiente durante 15 min por lavado. La determinación del receptor AT₁ y de la β -actina se realizó en la misma membrana y para evitar la detección cruzada, se eliminaron los anticuerpos de la primera detección con agitación constante de la membrana en una solución de NaOH 0.2 M, durante 5 minutos (rasurado).

6.5. REACCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

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

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

7. ANÁLISIS DEL CONSUMO DE OXÍGENO EN MITOCONDRIAS

7.1. AISLADO Y PURIFICADO DE LAS MITOCONDRIAS RENALES

De las muestras de riñón de los grupos de ratas se aislaron y purificaron las mitocondrias, se colocaron las muestras de riñón en un buffer H (Tris-HCl, NaCl, CaCl_2 y mercaptoetanol a un pH de 7.4) y un buffer KPR (NaCl, KCl, CaCl_2 , MgSO_4 , glucosa y Na_2HPO_4 a un pH de 7.4).

7.2. DETERMINACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS POR EL MÉTODO DE BIURET

Una vez aisladas y purificadas las mitocondrias de riñones de ratas cada grupo. Se realizó una curva de calibración con BSA. Para ello se emplearon volúmenes correspondientes a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 μg de proteína, se agregó el reactivo de Biuret y se incubó a temperatura ambiente, 30 minutos, para después tomar la lectura de absorbencia a 540 nm (Espectrofotómetro UltrospecTM 3300 pro, Amersham Biosciences uv/visible). La curva de calibración se hizo en Excel (Microsoft Office) y por interpolación se estimó la concentración de proteínas en las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

7.3 ANALISIS DEL CONSUMO DE OXÍGENO DEL ESTADO 3 Y 4 DE LA CADENA RESPIRATORIA

Se colocaron las mitocondrias a una concentración de 0.5 mg/ml y el medio de oxímetria (Hepes, KCl, KH_2PO_4 y MgCl_2) en la cámara del oxímetro en volumen final de 3000 ml. Se dejó estabilizar por 1 minutos y se arrancó el graficador (Scopeview) y se colocaron los inhibidores de la cadena respiratoria, succinato para medir el consumo de O_2 en el estado 3 y rotenona para medir el consumo de O_2 en el estado 4.

Las muestras de mitocondrias renales se sometieron al mismo tratamiento. La curva de calibración se hizo en Excel (Microsoft Office) y empleando la ecuación de la línea recta, se obtuvieron los valores del consumo de O_2 en el estado 3 y 4 de cada grupo de ratas.

8. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR EL MÉTODO DE GRIESS

De las mitocondrias aisladas y purificadas se tomaron muestras de 0.1 mg, a las cuales se les añadió succinato y rotenona, en un volumen final de 2 ml. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó HClO_2 40 ml al 20%. Se centrifugó la muestra a 3000 rpm durante 5 min. Se tomó una muestra del tubo de 1.4 ml y se agregó el reactivo de Griess 100 μl y se incubó por 30 minutos en oscuridad absoluta para finalmente leer la absorbancia a 540 nm (Espectrofotómetro UltrospecTM 3300 pro, Amersham Biosciences uv/visible). Las muestras de mitocondrias renales se sometieron al mismo tratamiento. La curva de calibración se hizo en Excel (Microsoft Office) y por interpolación se estimó la concentración de NO_2^- y NO_3^- en las muestras, empleando la ecuación de la línea recta (Green y col., 1982).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ error estándar utilizando el programa Sigma Plot 11.0 para la construcción de las gráficas. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías comparando todos los grupos en el programa Sigma Stat 3.0 (Advisory Statistical Software). Para los promedios de los resultados de peso corporal, PAS, niveles de urea y creatinina, PP, la expresión del receptor de la Ang II AT₁, el consumo de O₂ en el estado 3 y 4 y los niveles de ON mitocondrial, por tratarse de variables con distribución normal y ser de tipo continuo se utilizó ANOVA de una vía, seguida de una Student Newman Keuls. En todos los casos se tomó como nivel de significancia estadística una $p < 0.05$

VII. RESULTADOS

1. PESO DE LOS ANIMALES

Se registró el peso y el consumo de H₂O de los animales diariamente debido a que se ha reportado que la HA aumenta el consumo de H₂O y disminuye el peso de las ratas y para ajustar diariamente las dosis de los fármacos, y descartar la posibilidad de que los fármacos alteraren este parámetro debido a que su administración fue vía oral.

Al analizar los datos del peso corporal de los animales se observó un aumento en el peso conforme avanzó la edad de las ratas, en ambas sepas y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratas. Por otro lado, los tratamientos con L-NAME y captopril no modificaron la ingesta de alimento y H₂O ni el peso corporal de las ratas de cada grupo (**figura 5**). Sin embargo, los animales aumentaron su peso corporal alrededor de 100 gramos durante las 4 semanas que duró el tratamiento.

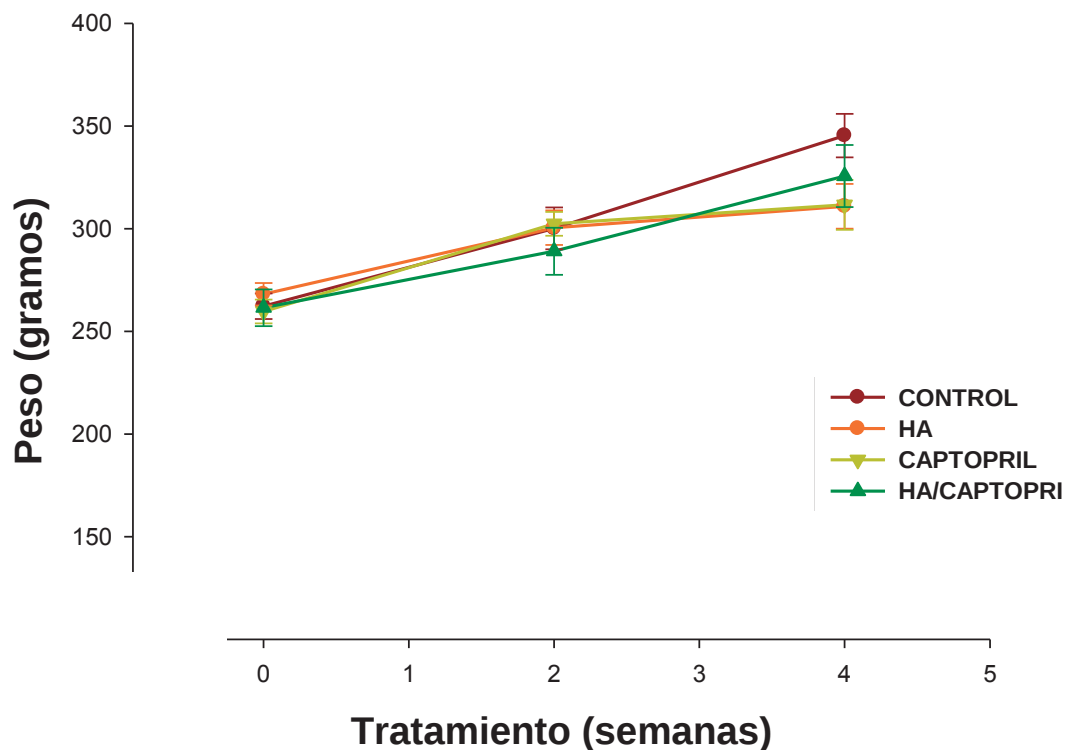


Figura 5. Valores del peso (g) de las ratas de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, durante el periodo de tratamiento (4 semanas). Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales.

En el registro de los pesos corporales de cada una de las ratas de los 4 grupos, al realizar un análisis estadístico no se encontró ninguna diferencia estadística en el peso corporal de las ratas durante las 4 semanas que duro el tratamiento, como se observa claramente en la **figura 5**.

2. REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Se realizó la medición de la PAS para confirmar la HA producida por el L-NAME y la eficacia del tratamiento antihipertensivo con captopril.

Se realizaron 3 tomas de la PAS para ver como los tratamientos en los 4 grupos de ratas modificaban los valores de PAS (**figura 6**).

2.1. VALORES DE PRESIÓN ARTERIAL SISTOLICA

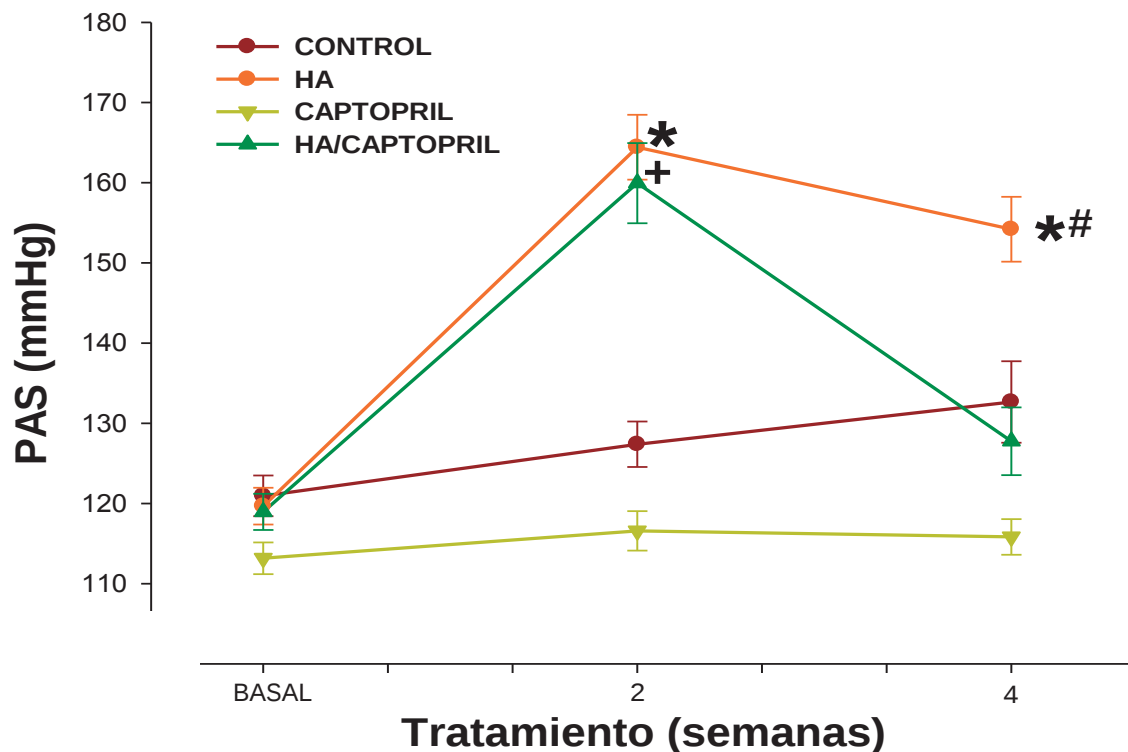


Figura 6. Valores de PAS (mmHg) de los grupos de ratas Control, HA, Captopril e HA/Captopril durante el periodo de tratamiento de 4 semanas. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales. * $p < 0.05$ vs. Control, + $p < 0.05$ vs. Captopril, # $p < 0.05$ vs. HA/Captopril; SNK.

Durante el periodo de tratamiento se realizaron 3 tomas de la PAS a cada rata de los cuatro grupos. En la **figura 6** se muestran los resultados obtenidos donde se observa lo siguiente:

En la toma de la PAS basal al realizar pruebas estadísticas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos de ratas y los valores de PAS fueron normales. Una vez realizada esta medición se inicio con el tratamiento correspondiente a cada grupo de ratas.

A las 2 semanas de tratamiento correspondiente al grupo de ratas. Se realizó la siguiente toma de la PAS y al realizar las pruebas estadísticas, se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos entre el grupo de ratas Control y Captopril y sus valores de PAS son normales, sin embargo los valores de PAS aumentaron por arriba de los 140 mmHg en los grupos de ratas HA e HA/Captopril, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al grupo de ratas Control y Captopril. Una vez establecida la HA en los grupos de ratas HA e HA/Captopril a estas 2 semanas de tratamiento con L-NAME, fue en este día donde se inició con el tratamiento antihipertensivo con captopril en los grupos de ratas Captopril e HA/Captopril.

En la última toma, al realizar las pruebas estadísticas se encontró que los valores de PAS son normales en los grupos de ratas Control, Captopril e HA/Captopril no habiendo diferencias estadísticas entre estos grupos de ratas; sin embargo, disminuyó la PAS hasta valores normales en el grupo de ratas HA/Captopril, y en el grupo de ratas HA se mantuvieron los valores de PAS arriba de los 140 mmHg y presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de ratas Control e HA/Captopril.

3. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES DE DAÑO RENAL

Para ver la función renal a este periodo de tratamiento se midieron dos marcadores de daño renal, la urea y la creatinina.

3.1. DETERMINACIÓN DE UREA

Se midieron los niveles de urea en suero al final del tratamiento en cada una de las ratas de cada grupo (**figura 7**).

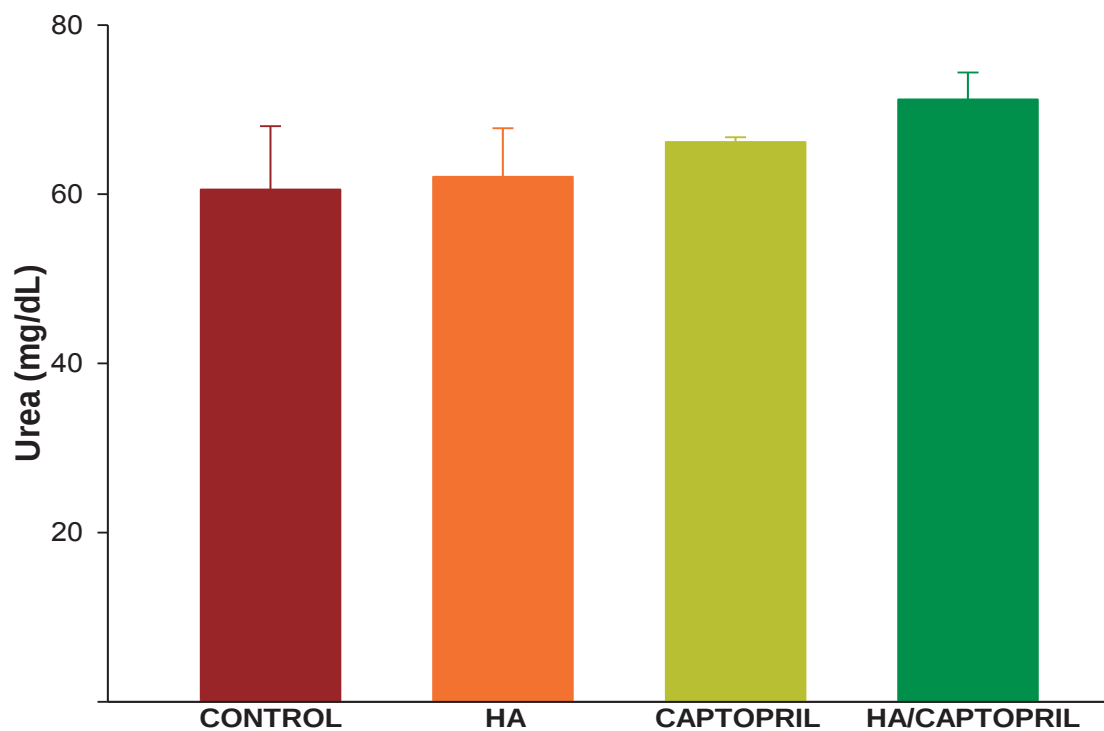


Figura 7. Valores de urea (mg/dL) de las ratas de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales.

Al medir los niveles de urea en suero (**figura 7**), no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los grupos de ratas Control, HA, Captopril e HA/Captopril.

3.2 DETERMINACIÓN DE CREATININA

Se midieron los niveles de creatinina en suero al final del tratamiento en cada una de las ratas de cada grupo (**figura 8**).

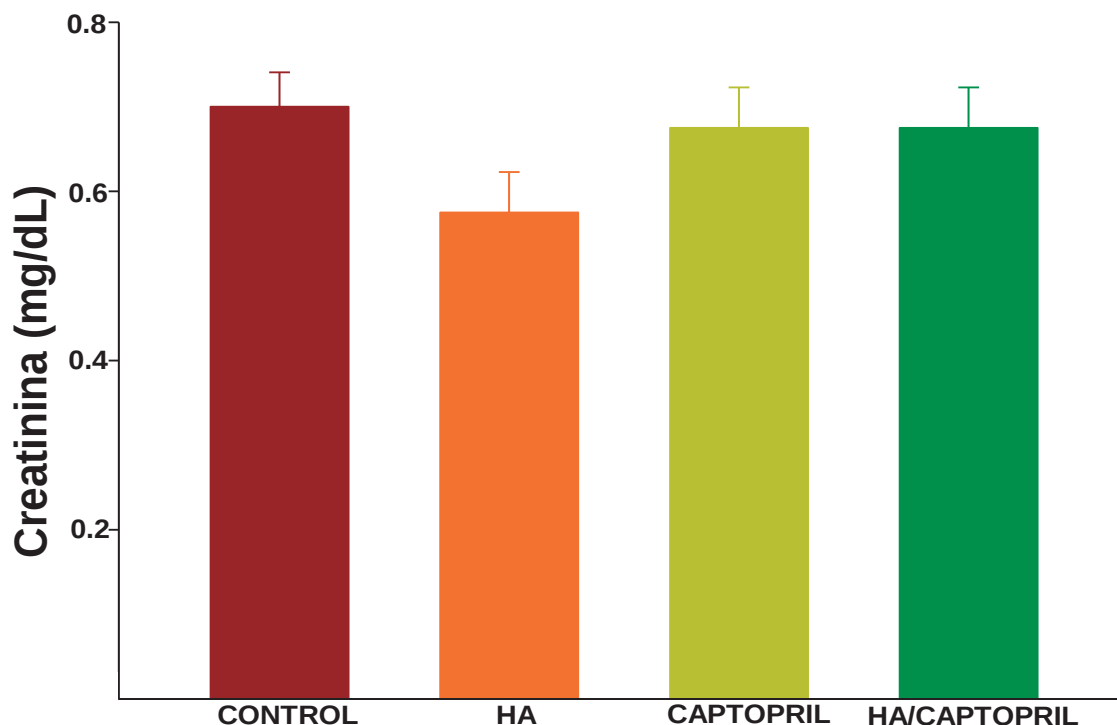


Figura 8. Valores de creatinina (mg/dL) de las ratas de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales.

Al medir los niveles de urea en suero (**figura 8**) donde al realizar las pruebas estadísticas no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los grupos de ratas Control, HA, Captopril e HA/Captopril.

4. HISTOLOGÍA RENAL

Los cambios estructurales dentro del riñón también son importantes y se manifiestan cuando existe una alteración, por lo tanto para descartar algún cambio estructural a este periodo de tratamiento se realizó esta prueba.

4.1. ESTRUCTURA GLOMERULAR A UNA AMPLITUD DE 10X

Se tomaron fotografías de riñones de cada grupo a una amplitud de 10X para analizar la estructura de los glomérulos renales (**figura 9**).

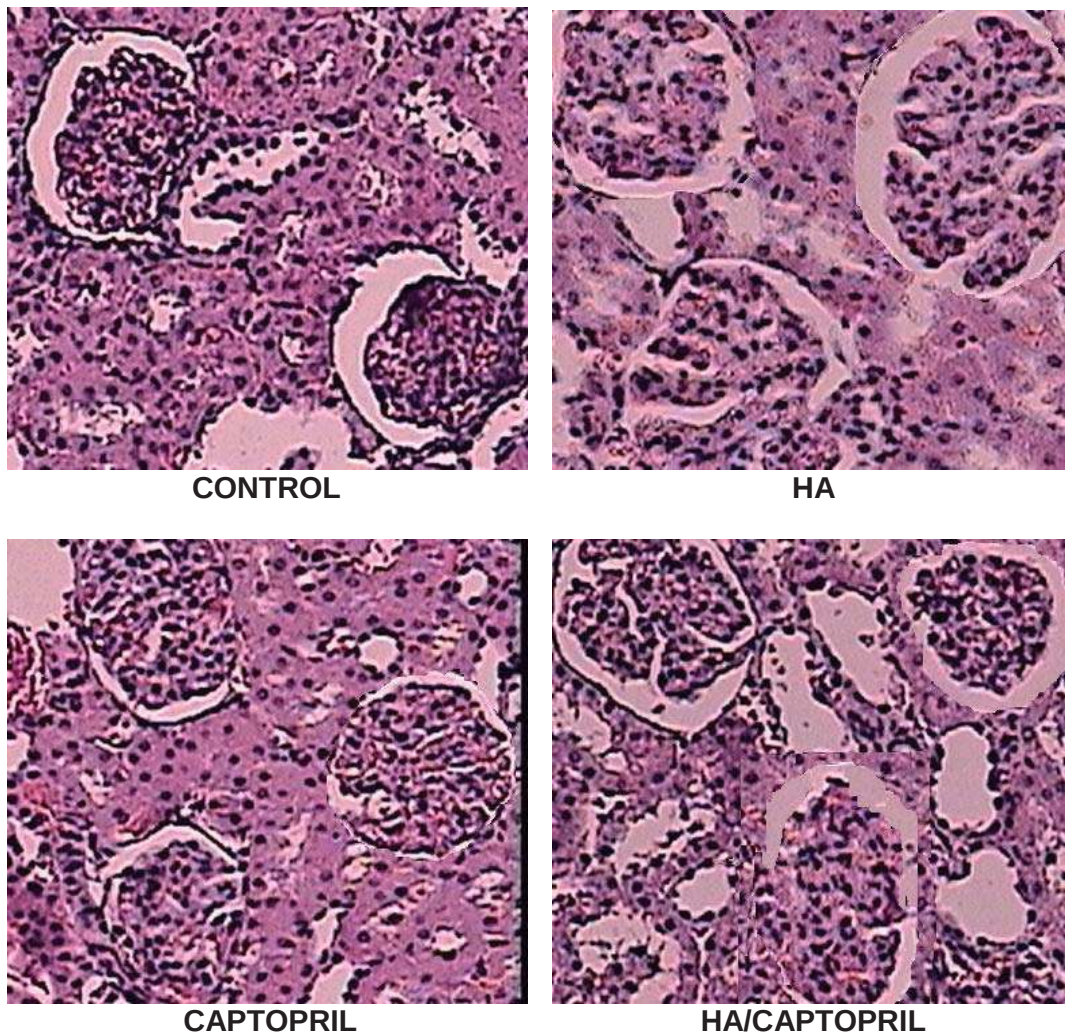


Figura 9. Fotografías representativas, a una amplitud de 10X, de los glomérulos renales de las ratas de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento.

4.2. ESTRUCTURA GLOMERULAR A UNA AMPLITUD DE 40X

Para analizar a más detalle se tomaron fotografías a una amplitud de 40X (figura 10).

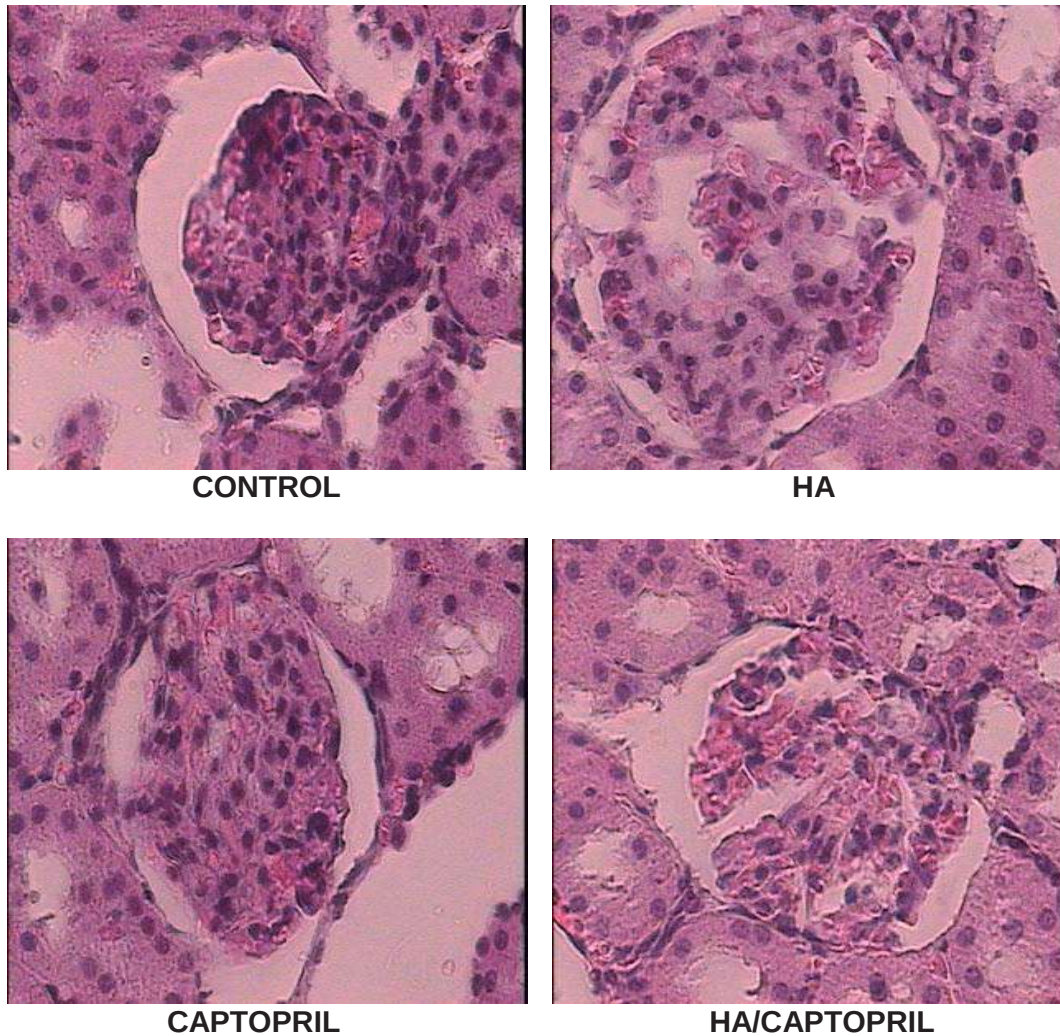


Figura 10. Fotografías representativas, a una amplitud de 40X, de los glomérulos renales de las ratas de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento.

Al observar al microscopio la estructura glomerular de cada riñón de ratas de los diferentes grupos a una amplitud de 10X se mostraban cambios importantes en estas estructuras entre los grupos de ratas, cambios en la densidad celular, la integridad y tamaño de los glomérulos.

Los riñones de las ratas del grupo HA mostraban aumento en el tamaño de los glomérulos, así como una baja densidad celular y un tamaño más grande de los glomérulos respecto a los demás grupos de ratas (**figura 9**).

Para caracterizar y evidenciar estos cambios entre los glomérulos de los riñones de las ratas de cada grupo, se realizó un acercamiento a 40X (**figura 10**) posteriormente, se hizo un análisis minucioso de cada glomérulo de los riñones de las ratas de cada grupo donde se observó que los glomérulos de los riñones de las ratas del grupo control mostraban una integridad normal.

Al comparar las estructuras glomerulares de este grupo de ratas control con los demás se observó que el 30% de los glomérulos de los riñones de las ratas del grupo HA presentaron daños como es una baja densidad celular, un aumento del tamaño de los glomérulos y una desintegración glomerular. Los glomérulos de los riñones de las ratas del grupo Captopril sólo presentaron un 2% de daño en los glomérulos y el grupo de ratas HA/Captopril un 5% de daño en los glomérulos de los riñones.

5. RESPUESTA RENAL A LA ANGIOTENSINA II

La PP renal provee información acerca de la sensibilidad del riñón a este periodo de tratamiento y si ésta se altera con alguno de los fármacos administrados. Además, se realizó un análisis de la respuesta del riñón a una sustancia vasopresora, la Ang II, en riñones de ratas de estos grupos.

5.1. PRESIÓN DE PERFUSIÓN RENAL

Se midió la PP en cada riñón de cada rata de los 4 grupos, al término del tratamiento (**figura 11**).

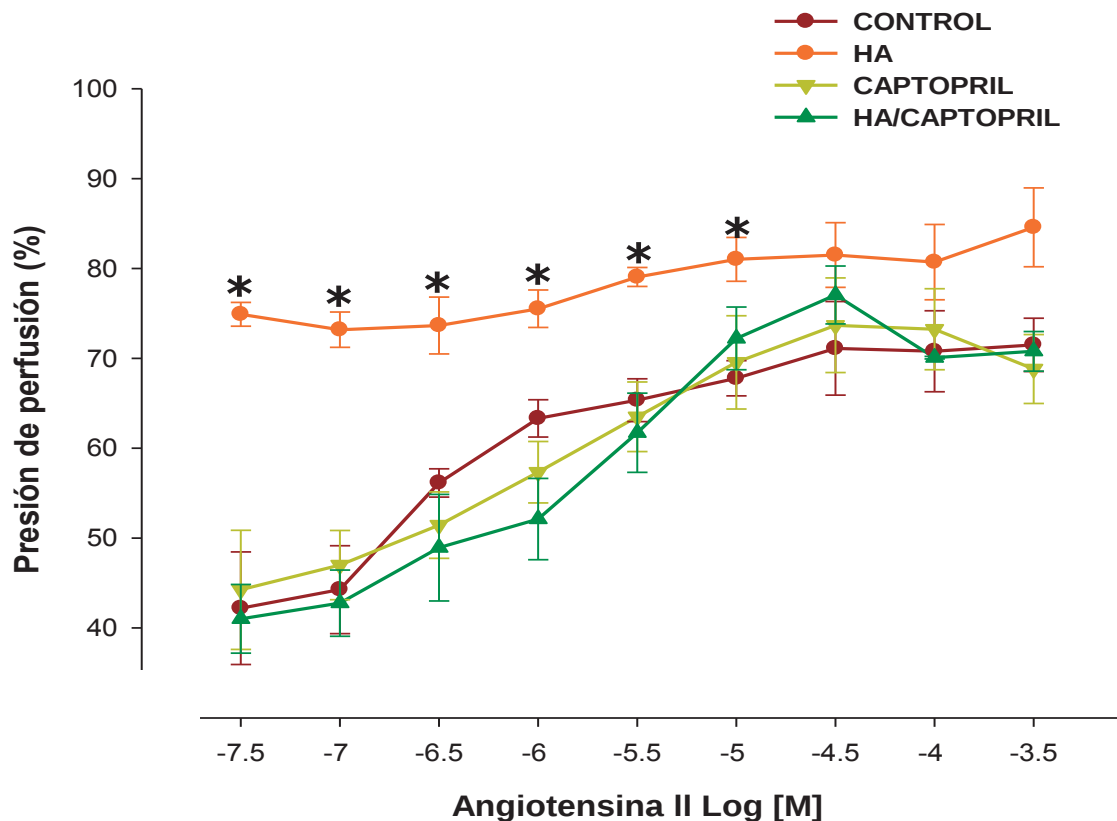


Figura 11. Valores de presión de perfusión (%) al administrar concentraciones de angiotensina II de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales. * $p < 0.05$ vs. Control; SNK.

En la **figura 11** se muestra la curva dosis-respuesta del riñón de cada rata de cada grupo donde se observó la PP dependiente de la dosis de Ang II de los grupos de ratas Control, HA, Captopril e HA/Captopril.

Observamos que los valores de PP en la primera administración de Ang II, al realizar las pruebas estadísticas observamos que no hay diferencia estadísticamente significativa en los grupos de ratas Control, Captopril e HA/Captopril y la PP aumentó un 40% en estos grupos y a medida que se aumentan las concentraciones de Ang II aumentó la PP hasta llegar a su efecto máximo donde ya no hay respuesta en la PP. Este comportamiento es similar en los grupos de ratas Control, Captopril e HA/Captopril.

Sin embargo el grupo de ratas HA desde la primera administración de Ang II la respuesta en la PP es casi de un 80% y es diferente estadísticamente significativo respecto al grupo de ratas control y esta diferencia se mantiene durante la administración de las siguientes concentraciones de Ang II hasta su efecto máximo.

6. EXPRESIÓN RENAL DEL RECEPTOR DE LA ANGIOTENSINA II AT₁

Debido a que para que la Ang II ejerza su efecto vasoconstrictor requiere la unión a su receptor AT₁.

Por tal motivo es importante saber como se encuentran los niveles de expresión de este receptor y analizar su participación en la respuesta en la PP con respecto a la administración de Ang II.

6.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AT₁

Se midieron los niveles del receptor de la Ang II AT₁ de cada una de las ratas de los 4 grupos, al término del tratamiento.

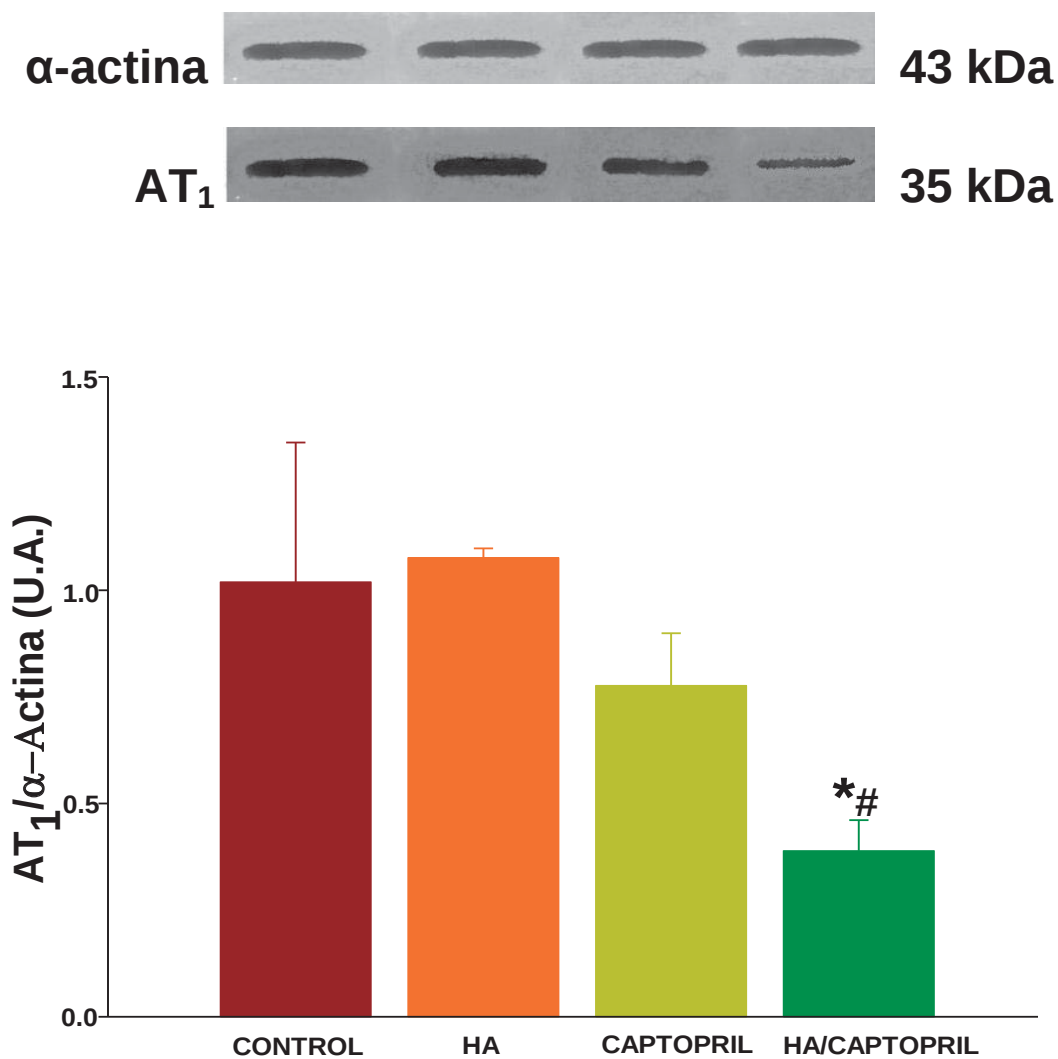


Figura 12. Valores de expresión del receptor AT₁ de la angiotensina II (U.A.), de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales. * $p < 0.05$ vs. Control, # $p < 0.05$ vs. HA/Captopril; SNK.

Se muestra en la **figura 12** los niveles de expresión del receptor AT_1 de la Ang II en el riñón de cada rata de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril. En la parte superior de la figura se muestran bandas representativas del AT_1 y de la α -actina la cual se utilizó para normalizar la proteína del receptor AT_1 y son representativas de la gráfica donde se muestran los valores cuantitativos del receptor AT_1 .

La expresión del receptor AT_1 en el grupo de ratas Control es basal y al realizar las pruebas estadísticas no se encontraron cambios estadísticamente significativos respecto al grupo de ratas HA y Captopril. Sin embargo si existen diferencias estadísticamente significativas en el grupo de ratas HA/Captopril en donde la expresión del receptor AT_1 es menor y el cual es diferente del grupo de ratas Control e HA.

7. VELOCIDAD DE RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Para determinar la función mitocondrial existen varios métodos para medirla la integridad mitocondrial y como se está llevando a cabo la síntesis de ATP.

Uno de estos métodos es midiendo el consumo de O_2 en el estado 3 y 4 que indica cómo es el flujo de protones en los complejos I, III y IV, y como se está llevando a cabo la síntesis de ATP dentro de la cadena respiratoria. Midiendo estos parámetros vamos a observar como la HA a corto plazo va estar afectando la función mitocondrial y el efecto del tratamiento antihipertensivo con captopril.

También se va a sacar un CR entre el estado 3 y 4 y con esto conocer cómo se encuentra trabajando la cadena respiratoria en cada uno de los grupos de ratas y con este valor determinar la función mitocondrial.

7.1. ESTADO 3 DE LA CADENA RESPIRATORIO

Se midió el consumo de O_2 en el estado 3 en las mitocondrias renales de cada rata de los 4 grupos (**figura 13**).

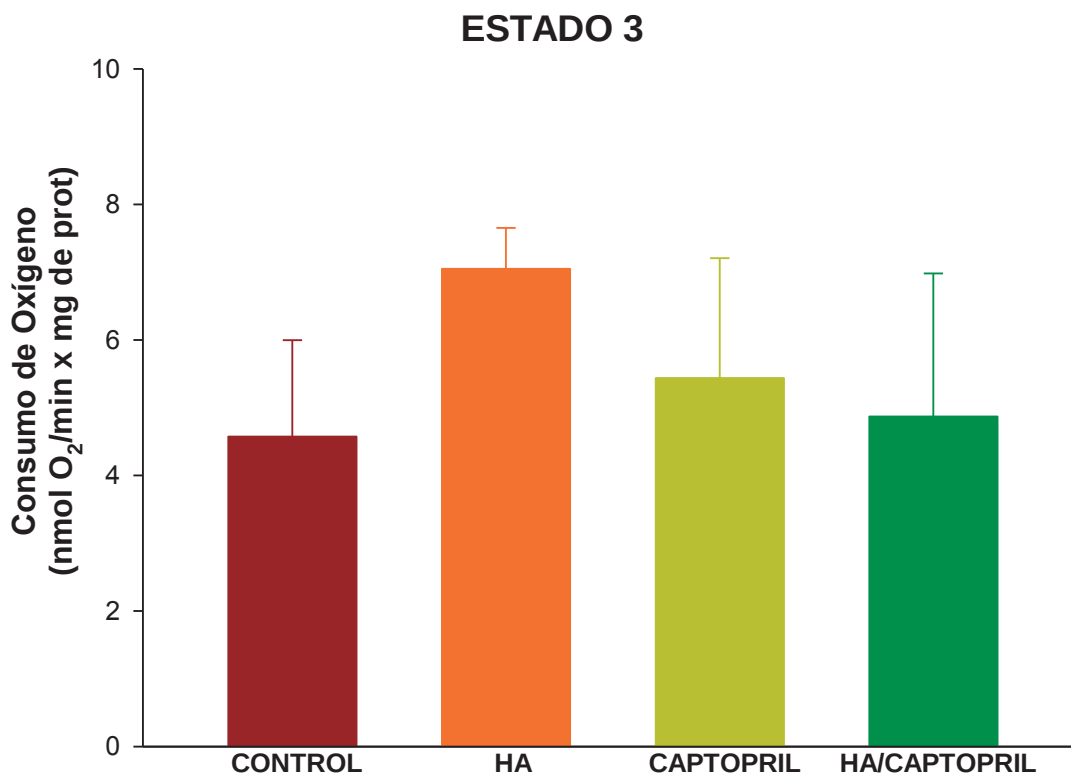


Figura 13. Consumo de O_2 (nmol O_2 /min X mg de proteína), de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales.

En cuanto al consumo de O_2 en el estado 3 (**figura 13**) se observó que al realizar las pruebas estadísticas no se muestran cambios estadísticamente significativos entre los grupos de ratas Control, HA, Captopril e HA/Captopril.

7.2. ESTADO 4 DE LA CADENA RESPIRATORIA

Se midió el consumo de O₂ en el estado 4 en las mitocondrias renales de cada rata de los 4 grupos (**figura 14**).

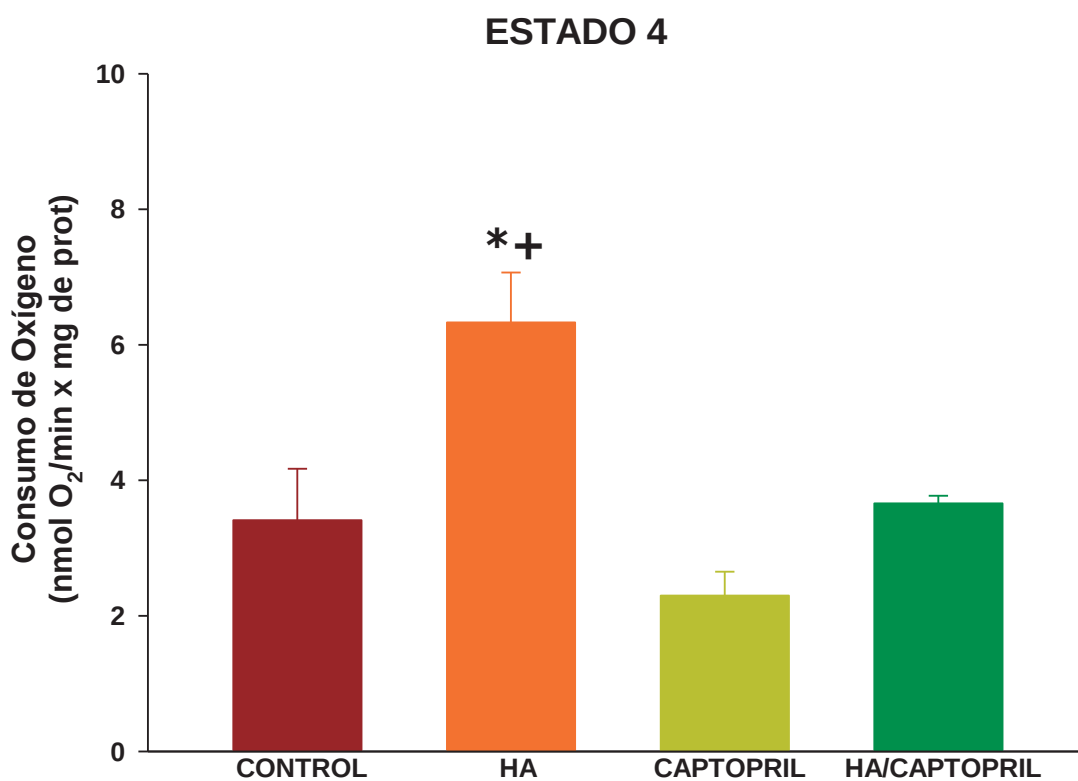


Figura 14. Consumo de O₂ (nmol O₂/min X mg de proteína), de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales. * p<0.05 vs. Control, + p<0.05 vs. Captopril; SNK.

En el consumo de O₂ en el estado 4 (**figura 14**) al realizar las pruebas estadísticas se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratas Control, Captopril HA/Captopril. En el grupo de ratas HA si se observa un aumento del consumo de O₂ y es diferente estadísticamente significativo del grupo de ratas Control.

7.3. COCIENTE RESPIRATORIO

Se determinó el cociente del estado 3 entre el estado 4 el cual indica el grado de acoplamiento de la cadena respiratoria de las mitocondrias renales de cada una de las ratas de cada grupo (**tabla 5**).

	Estado 3	Estado 4	CR
Control	5	3	2
HA	7	6	1
Captopril	5	2	3
HA/Captopril	5	4	1

Tabla 5. Cociente respiratorio de las mitocondrias renales de los grupos de ratas Control, HA, Captopril e HA/Captopril.

El valor del CR (**tabla 5**) en el grupo de ratas Control es de 2 lo que indica que la cadena respiratoria trabaja de forma normal, el grupo de ratas HA al igual que el grupo de ratas HA/Captopril, tienen un valor de CR de 1 y es diferente del grupo de ratas Control, este valor indica un desacoplamiento dentro de la cadena respiratoria en estos grupos de ratas, el grupo de ratas Captopril su CR es de 3 este valor indica las mismas condiciones que el grupo de ratas Control.

8. PARTICIPACION DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL EN RIÑÓN

El ON tiene una importante función en la mitocondria dentro de la cadena respiratoria en el complejo IV regula el consumo de O₂ compitiendo por el lugar.

8.1. NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

Se midieron los niveles de ON mitocondrial mediante el método de Griess en cada una de las ratas de los 4 grupos, al término del tratamiento (**figura 15**).

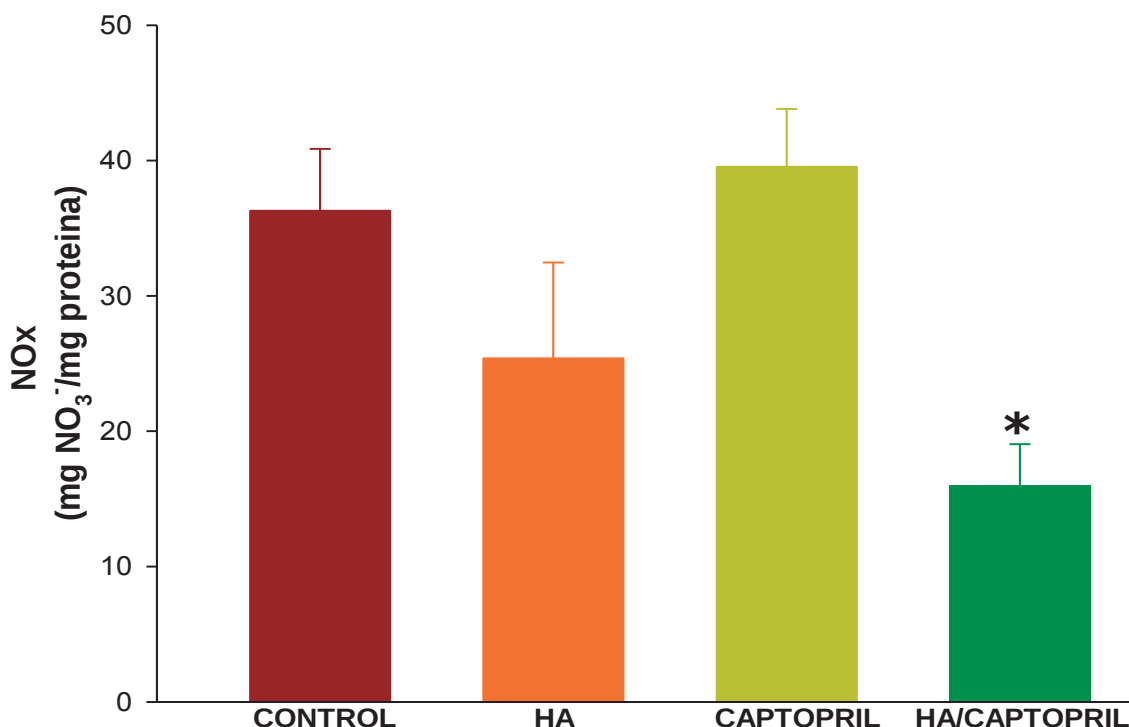


Figura 15. Niveles de óxido nítrico mitocondrial (mg NO₃⁻/mg de proteína), de los grupos Control, HA, Captopril e HA/Captopril, al término del periodo de tratamiento. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 animales. * $p < 0.05$ vs. Control; SNK.

En la **figura 15** se muestran los niveles de NO₃⁻ que son metabolitos estables de la síntesis de ON, por lo tanto podemos hablar de niveles de ON mitocondrial. Al realizar las pruebas estadísticas encontramos: en el grupo de ratas Control los niveles de ON mitocondrial son basales y no existen diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos de ratas HA y Captopril, sin embargo el grupo de ratas HA/Captopril los niveles de ON mitocondrial disminuyen y son diferentes estadísticamente significativo respecto al grupo de ratas Control.

VIII. DISCUSIÓN

1. PESO DE LAS RATAS

En el presente trabajo, durante el tiempo de tratamiento las ratas de los 4 grupos no modificaron el peso corporal, aunque se ha reportado que durante la HA en ratas SHR el peso corporal de las ratas disminuye. Bernatobá y col. (1999) después de un periodo de 4 semanas de tratamiento el modelo de HA con L-NAME observó que el tratamiento con captopril no modificó el peso corporal de las ratas en dosis diferentes a las empleadas en este trabajo. Se sugiere que en el modelo de HA con L-NAME, debido a que el tratamiento se inicia en una etapa adulta de la rata y el periodo de administración es muy corto no se presentan cambios en el peso corporal de las ratas en comparación con las ratas SHR, en las cuales la HA se establece a los dos meses de edad desde el nacimiento y a esta edad ya presentan cambios importantes en el peso corporal, en comparación con las ratas normotensas.

2. PRESIÓN ARTERIA SISTÓLICA

Existe una diversidad de estudios que demuestran que la inhibición crónica de la síntesis de ON con L-NAME en la rata produce HA (Zatz y col., 1998; Török, 2009). En este trabajo desde las primeras 2 semanas de tratamiento con L-NAME se estableció la HA y los valores de PAS se encontraban arriba de los 140 mmHg y estos valores de PAS se mantuvieron a las 4 semanas de tratamiento con L-NAME. Datos de nuestro laboratorio (Rivera-Jardón y col., 2009), observaron que en ratas con 2 semanas de tratamiento con L-NAME la HA se estableció y los valores de PAS se encontraban por encima de los 140 mmHg.

La inhibición de la síntesis de ON en este modelo de HA con L-NAME es suficiente para aumentar los valores de PAS desde las primeras semanas de tratamiento como se observa en este trabajo y en la literatura. Aunque existen diversos modelos de HA todos tienen características similares como es la disfunción endotelial causado por un daño al endotelio donde se lleva a cabo la síntesis de diversas sustancias vasoactivas descrito por Török (2009).

La eficacia de implementar un tratamiento antihipertensivo es clara y en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede constatar, debido a que observamos como 2 semanas de tratamiento con captopril durante la HA con L-NAME son suficientes para disminuir los valores de PAS, por debajo de los 140 mmHg, alcanzando valores de PAS similares a los de las ratas control. Colonna y col. (2005) observaron que la inhibición de la ECA es capaz de disminuir la PAS aún en modelos de HA con L-NAME. El SRA juega un importante papel en la regulación de la PA y en estadios de HA se encuentra sobreactivado. Además, datos de nuestro laboratorio (Rivera-Jardón y col., 2009; Figueroa-Guillén y col., 2009) muestran que el modelo de HA por L-NAME, el SRA tiene una participación muy importante evidenciada por una hiperreactividad a la Ang II tanto en el riñón como en la vasculatura total y este fenómeno es mediado por el receptor AT_1 en ambos casos. Los datos del presente trabajo, los de trabajos previos de nuestro laboratorio y los de la literatura sugieren que la inhibición de este sistema con captopril es suficiente para disminuir los valores de PAS.

En ratas normotensas se observó que la administración con captopril no alteró los valores de PAS. Sin embargo, Bernatobá y col. (1999), reportaron que el tratamiento con captopril a dosis más altas, que la empleada en el presente trabajo, en ratas normales puede producir una hipotensión. Cabe resaltar que los agentes antihipertensivos pueden producir 2 efectos importantes sobre la PA y estos dependen de las cifras tensionales del individuo y de la dosis empleada.

Se considera que una dosis de un antihipertensivo determinado es hipotensora cuando la administración en individuos normotensos (PA normal) produce un descenso de la PA. Este descenso en la PA puede no ser benéfico para este tipo de individuos. Por otro lado, se considera que una dosis es antihipertensiva cuando la administración en individuos hipertensos produce un descenso de la PA hasta valores de PA normales, es decir abolen la HA. Adicionalmente, los efectos de los fármacos antihipertensivos dependen del periodo de tiempo de tratamiento.

Una explicación probable para los datos obtenidos en el presente trabajo donde la concentración utilizada de captopril fue antihipertensiva pero no fue capaz de llevar los valores de PA hasta los valores del control puede ser que el periodo de tratamiento o la dosis no haya sido suficientes para normalizar las cifras de PA.

3. MARCADORES DE DAÑO RENAL

La determinación de urea y creatinina se realiza para medir la función renal, Cavanagh y col. (2006) observaron que los niveles de urea y creatinina se ven afectados durante estadios de HA crónica en ratas SHR. El tiempo de HA en este trabajo fue corto y quizás por tal motivo no se observaron cambios en los niveles de urea y creatinina. Además de que los cambios en estos marcadores de daño renal se observan cuando las funciones renales se encuentran muy comprometidas y el daño es irreversible. Aunque el riñón tiene un importante papel en la regulación de la PA y de ello depende la TFG, el no observar cambios en los marcadores de daño renal en este trabajo es quizás debido al tiempo de HA.

4. HISTOLOGÍA RENAL

El riñón tiene una estructura basada en capilares donde se lleva a cabo la filtración glomerular y que en estadios de HA disminuye significativamente la TFG, aunque estos cambios se manifiestan en cambios en los marcadores de daño renal, se han observado otros cambios estructurales en el riñón, como son los cambios en la estructura glomerular en ratas SHR. Cavanagh y col., (2006) observaron una densidad celular menor y un tamaño mayor en el glomérulo de ratas SHR en periodos crónicos de HA. Sin embargo, en este trabajo al realizar cortes histológicos en los riñones de las ratas de los 4 grupos observamos que en HA temprana estas alteraciones en los glomérulos se manifiestan.

Los ARA`s e IECA`s además de disminuir los valores de PAS también tienen una actividad renoprotectora. Cavanagh y col., (2006) observaron que los efectos de los ARA`s no solo se manifiesta en el control de la HA, sino también sobre la estructura renal, en donde en ratas SHR con HA crónica la administración prolongada de losartán, evita los daños renales ocasionados por la HA en ratas SHR. También en este trabajo observamos la renoprotección con otro inhibidor del SRA que es el captopril, un IECA`s, en HA temprana con L-NAME donde se observa claramente que el tratamiento con captopril durante la HA evita los daños estructurales de los glomérulos causados por la HA temprana.

5. RESPUESTA RENAL A LA ANGIOTENSINA II

Rivera-Jardón y col. (2009) observaron que la HA por L-NAME produce daño marcado al riñón y además activa el SRA renal, específicamente produce una respuesta aumentada a la Ang II.

En este trabajo observamos claramente este efecto al observar una hipersensibilidad en ratas con HA y una mayor respuesta a la Ang II en la PP. Navar y col. (2001) propusieron que esta respuesta renal aumentada a la Ang II quizás se deba a que todos los componentes necesarios para la generación de Ang II están presentes dentro del intersticio renal.

Rivera-Jardón y col. (2009), reportaron que la deficiencia de la producción de ON en este modelo lleva a la activación del SRA provocando una hipersensibilidad a la Ang II en la vasculatura periférica, probablemente atribuido a un aumento en la expresión del receptor AT_1 . En el presente trabajo observamos también que se previene la hipersensibilidad al inhibir el SRA con captopril el cual se comporta similar al grupo de ratas control. Probablemente la hipersensibilidad presente en los riñones de ratas HA es debida a la sobreactivación del SRA, puesto que al colocar el captopril se previene esta hipersensibilidad.

6. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AT_1

El receptor AT_1 se ha localizado en células de MLV a través de toda la vasculatura renal, incluyendo arteriolas aferentes y eferentes, células mesangiales observado por Navar y col. (2001). Rivera-Jardón y col. (2009), reportaron que dentro del riñón la expresión del receptor AT_1 en HA con L-NAME no se ve afectada puesto que es similar a las ratas control. Estos reportes se apoya con los resultados del presente trabajo donde, por una parte la HA provoca una hipersensibilidad en el riñón, pero está no es por un aumento de la expresión del receptor AT_1 , por otra parte la sensibilidad en el riñón es normal en ratas con HA que recibieron un tratamiento antihipertensivo con captopril; sin embargo, los niveles de expresión del receptor AT_1 se encuentran disminuidos. Estas evidencias apuntan a que la hipersensibilidad renal es ocasionada por una afinidad mayor al receptor AT_1 y una amplificación de señales aumentada y no debido a un aumento en la expresión del receptor AT_1 .

7. ESTADOS RESPIRATORIOS

Los resultados obtenidos muestran en el grupo de ratas HA disfunción mitocondrial y el tratamiento antihipertensivo con captopril no evita el daño causado por la HA como se observa en el grupo de ratas HA/Captopril. Piotrkowski y col. (2007) observaron que durante la administración de L-NAME los niveles de H_2O_2 y la actividad de los oxidantes dentro de las mitocondrias y la actividad de la NOS mitocondrial disminuyen aún en presencia de un tratamiento con enalapril (un IECA's). Probablemente en el desequilibrio causado por la HA con L-NAME los efectos del captopril no son suficientes para evitar el daño mitocondrial, además que el periodo de tratamiento con captopril es muy corto. Se ha reportado que los efectos del captopril dependen del periodo de tiempo de administración.

8. SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

Bernatobá y col. (1999) observaron que durante la inhibición prolongada de la NOS en la administración con L-NAME disminuyen los valores de ON endotelial en el riñón y el tratamiento con captopril no es capaz de prevenir esta disminución. Sin embargo, en este estudio observamos que las concentraciones de ON mitocondrial en ratas HA no disminuyen, pero observamos que en el grupo de ratas HA/Captopril se observa una disminución de la síntesis de ON mitocondrial. Al parecer la relación que existe entre el ON y al Ang II es la variable que hace falta indagar, por un lado la Ang II aumenta la producción de radicales libres y provoca un desacoplamiento de la NOS endotelial y quizás de la NOS mitocondrial también reportes de Doughan y col., (2008). Por otro lado, la inhibición de la síntesis de ON aumenta la actividad del SRA (Rivera y col., 2009). Probablemente, la participación de las isoformas de la NOS podría aportar información valiosa que pueda explicar, en parte el fenómeno observado. Otro punto a abordar es la relación que pudiera existir entre el modelo de L-NAME y las isoformas de la NOS.

IX. CONCLUSIONES

Debido a que los tratamientos no modificaron los pesos corporales de las ratas, esta no es una variable que pudiera afectar los demás experimentos. Y al corroborar la HA causada por la administración de L-NAME y los efectos antihipertensivos del captopril durante la HA temprana en los valores de PAS.

Pudimos comprobar que aunque no se manifiestan alteraciones en los marcadores de daño renal a este periodo de HA temprana, si se observan daños estructurales en los glomérulos en el grupo de ratas HA, daños que son prevenidos o revertidos por el tratamiento antihipertensivo con captopril en el grupo de ratas HA/Captopril. Y no solo eso también existe una hipersensibilidad renal durante la HA temprana que también es prevenida por el tratamiento antihipertensivo con captopril, pero esta hipersensibilidad no es causada por un aumento en la expresión del receptor de la Ang II AT₁, sino mas bien a la afinidad y amplificación de señales debido a que los niveles de expresión del receptor de la Ang II AT₁ en la HA temprana son similares a los de las ratas control aunque la respuesta renal sea diferente, además de que los niveles de expresión del receptor de la Ang II AT₁ en el grupo HA /Captopril son menores, mas sin embargo la respuesta renal es similar al grupo de ratas Control, por lo tanto la respuesta renal a la Ang II depende de la afinidad de la Ang II a su receptor y a la amplificación de señales.

En lo que respecta a las mitocondrias renales el daño causado por la HA es irreversible aun con el tratamiento antihipertensivo con captopril, a este periodo de HA temprana ya se está dañando la función mitocondrial y al parecer la participación del ON mitocondrial tiene una participación importante. Por todo esto se sugiere que:

La angiotensina II contribuye a las alteraciones renales y mitocondriales en la hipertensión arterial temprana.

X. REFERENCIAS

Bergström G., Johansson., Wickman A., Gan L. And Torup C., **2002**. Brief treatment in young spontaneously hypertensive rats abates long-term blood pressure elevation by effects on renal vascular structure. *J. Hypertension*: 1413-1421.

Bernatova Iveta, Olga Pechansova and Fedor Simkot., **1999**. Effect of captopril in l-name-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Experimental Physiology*:1095-1105.

Boveris A. and Poderoso J. J., **2000**. Regulation of oxygen metabolism by nitric oxide. In: Nitric Oxide: *Biology and Pathobiology*, edited by Ignarro LJ. Los Angeles: Academic: 355–367.

Cavanagh Elena M. V. de, Jorge E. Toblli, León Ferder, Bárbara Piotrkowski, Inés Stella, and Felipe Inserra., **2006**. Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*: R1616–R1625.

Chen Yan, Dongsoo Kim, Toru Aizawa, Bradford C. Berk., **2003**. Functional Interplay Between Angiotensin II and Nitric Oxide Cyclic GMP as a Key Mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: 23:26-36.

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., **2003**. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: *the JNC 7 report*: 2560-72.

Colonna De Gennaro V., Rigamonti A., Fioretti S., Bonomo S., Manfredi B., Ferrario P., Bianchi M., Berti F., Muller E. E. and Rossoni G., **2005**. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*: 253–259.

Cruz Corchado Mariela., **2001**. Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México. *Archivos de cardiología de México*: 192-197.

Cruz Mérida Aarón, León Hernández Francisco Javier, Hernández y Hernández Héctor., **2004**. Regulación normal de la presión arterial sistémica. *Revista mexicana de Cardiología*; 30-41.

Deedwania Prakash C. M., **2000**. Hypertension and Diabetes New therapeutic Options. *ARCH INTERN MED*: 1585-1594.

Doughan Abdulrahman K., David G. Harrison, Sergey I. Dikalov., **2008**. Molecular Mechanisms of Angiotensin II–Mediated Mitochondrial. *Circ. Res*: 488-496.

Duarte Mariano y Dvorkin Mario A., **2003**. Presión arterial. In: Best and Taylor, ed. *Bases fisiológicas de la práctica médica*. 13a edición en español ed. Editorial médica panamericana: 241-61.

Elsayed E. F., Tighiouart H., Griffith J., Kurth T., Levy A. S., Salem D., Sarnak M. J. And Weiner D. E., **2007** Cardiovascular disease and subsequent kidney disease. *Arch Intern Med*:1130-6.

Figueroa-Guillén Edgar Saúl, Patricia Castro-Moreno, Felipe Francisco Rivera-Jardón, Itzell A Gallardo-Ortiz, Maximiliano Ibarra-Barajas and Daniel Godínez-Hernández., **2009**. Angiotensin II Pressor Response in the L-NAME-Induced Hypertensive Pithed Rat: Role of the AT1 Receptor. *Proc. West. Pharmacol. Soc*: 54-56.

Flores J., Armijo J. A. y Mediavilla A., **1997**. *Farmacología humana mediadores celulares III*. Angiotensinas; cininas, citocinas y otros mediadores peptídicos. 3 edición, editorial masson: 343-347.

Garrison J. C. and Peach M. J., **1991**. Renina y Angiotensina. In: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (8th ed.), edited by Gilman AG, Rall TW, Nies AS, and Taylor P. Buenos Aires: Ed. Panamericana: 733–746.

Ghafourifar Pedram and Sen Chandan K. **2007**. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Frontiers in bioscience*: 1072-1087.

Giebisch Gerhard and Windhager Erich., **2005**. Organization of the urinary system. In: Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, eds. *MEDICAL PHYSIOLOGY*. updated edition ed. *Elsevier Saunders*: 737-73.

Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. I., Wishnok J. S. And Tannenbaum S. R., **1982**. Analisis of nitrate and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem*: 131-138.

Guyton Arthur C. M. D., Hall John E. PhD., **2006**. Formación de orina por los riñones: filtración glomerular, flujo sanguíneo renal y su control. *Fisiología médica*. 11a ed. Elsevier Saunders: 307-26.

Hekimi S. and Guarente L., **2003**. Genetics and the specificity of the aging process. *Science*: 1351–1354.

Hoffman Brian B. Terapéutica de la hipertensión. **2007**. In: Goodman and Gilman, ed. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11 ed. McGraw-Hill interamericana: 845-68.

Ishii Naohito, Patel Kaushik P., Lane Pascale H., Taylor Traci, Bian Ka, Murad Ferid, Pollock Jennifer S., Carmines Pamela K., **2001**. Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with Diabetes Mellitus. *Journal of the american society of nephrology*; 1630-1639.

Jackson Edwin K. Diuréticos. **2007**. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a ed. McGraw-Hill Interamericana In: *Goodman and Gilman*: 737-697.

Jackson Edwin K., **2007**. Renina y angiotensina. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a ed. McGraw-Hill Interamericana In: *Goodman and Gilman*: 789-821.

Kim Shokei and Iwao Hiroshi., **2000**. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews*: 11-32.

Kobori Hiroyuki, Nangaku Masaomi, Navar L.Gabriel, and Nishiyama Akira., **2007**. The intrarenal renina-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews*; 251-287.

Kobori Hiroyuki, Nangaku Masaomi, Navar L.Gabriel, and Nishiyama Akira., **2007**. The intrarenal renina-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews* : 251-287.

Matsubara Hiroaki., **1998**. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circulation research*: 1182-1191.

Mattson David L. And Cowley Jr.Allen W., **2007**. Nitric Oxide and hypertension. In: Carey Robert M. MM, ed. Hypertension and hormone mechanisms. Totowa, New Jersey 07512: *Contemporary endocrinology*: 225-44.

Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A., **1989**. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*: 1709-15.

Navar LG, Nishiyama A. Intrarenal formation of angiotensin II. *Contrib Nephrol* **2001**; 1-15.

Nour-Eddine Rhaleb, Xiao-Ping Yang, Masahiko Nanba, Edward G. Shesely, Oscar A. Carretero., **2001**. Effect of Chronic Blockade of the Kallikrein-Kinin System on the Development of Hypertension in Rats. *American Heart Association*; 121-128.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Madrid; **2007** Aug 2

Opie L. H., **2001**. Renoprotection by angiotensin-receptor blockers and ACE inhibitors in hypertension. *Lancet*: 1829–1831.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Madrid; **2007** Aug 29.

Paniagua R., Ramos A., Fabian R., Lagunas J. And Amato D., **2007**. Chronic kidney disease and dialysis in Mexico. *Perit Dial Int*: 405-9.

Phillips M. I., Mohuczy-Dominiak D., Coffey M., Galli M. S., Kimura B., Wu P. And Zelles T., **1997**. Prolonged reduction of high blood pressure with an in vivo, nonpathogenic, adeno-associated viral vector delivery of AT1-R mRNA antisense. *Hipertensión*: 374-380.

Piotrkowski Barbara, Cesar G. Fraga, and Elena M. V. de Cavanagh., **2009**. Mitochondrial function and nitric oxide metabolism are modified by enalapril treatment in rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*: R1494–R1501.

Pocock G. y Richards D., 2002. Fisiología humana: las bases de la medicina. Editorial Masson; 329-365.

Rivera-Jardón Felipe Francisco, Patricia Castro-Moreno, Edgar Saúl Figueroa-Guillén, Itzell Alejandrina Gallardo-Ortíz, Daniel Godínez-Hernández and Maximiliano Ibarra-Barajas., **2009**. Angiotensin II Augments Renal Vasoconstriction *via* AT1 Receptors in L-NAME-induced Hypertensive Rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc*: 47-49.

Rojas Rosalva, Oswaldo Palma, Ivet Quintana., **2006**. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. Instituto Nacional de Salud Pública. Primera edición.

Ross Sarah and Macleod Mary-Joan., **2003**. Hypertension in Diabetes: a perspective from clinical pharmacology. *The British Journal of Diabetes and Vascular Disease*: 252-256.

Schalkwijk C. G. And Stehouwer C. D., **2005**. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci*:143-59.

Schiffrin E. L., Lipman M. L. And Mann J. F., **2007**. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*: 85-97.

Sepúlveda Jaime., 2000. Encuesta Nacional de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. Report No.: 1.

Sosa-Luna Carlos Armando, Astudillo-de la Vega Horacio, Sánchez-González Dolores Javier, Martínez-Salas Sergio Gabriel, Valdez-Espinosa Ramón, Villalobos-Molina Rafael, Ibarra-Barajas Maximiliano., **2005**. Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vasculatura renal de ratas hipertensas. *Rev Sanid Milit Mex*;20-35.

Sowers J. R., 2004. Treatment of hypertension in patients with Diabetes. *Arch Intern Med*:1850-7.

Taddei Stefano, Viridis Agostino, Ghiadoni Lorenzo, Salvetti Antonio., **1998** Hipertensión y disfunción endotelial. Cardiovascular risk factors. *Inteligencia Clínica médica I: Médica 7*, Número 1.

Török J., **2008**. Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. *Physiol. Res*: 813-825.

Touyz Rhian and Schiffrin Ernesto L., **2000**. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*: 639-672.

Touyz R. M., **2004**. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?. *Hipertensión*: 248–252.

Weir M. R. and Dzau V. J., **1999**. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *AmJ Hypertens*: 205S-213S.

Zatz Roberto and Baylis Christine., **1998**. Chronic nitric oxide inhibition model. *Hipertensión*: 958-964.

Zenteno Juan Carlos y Kofman Alfaro Susana., **2003**. Aspectos genéticos de la hipertensión. *Revista Médica del Hospital General de México*: 218-223.