

00346  
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR RENAL POR EL FLUJO SANGUÍNEO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)  
P R E S E N T A :  
MARÍA DE LOURDES SÁNCHEZ SEVILLA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María de Lourdes Sánchez Sevilla

FECHA: 20-03-2003

FIRMA: María de Lourdes Sánchez Sevilla

DIRECTOR DE TESIS: DR. PABLO JÓRGE SUÁREZ MUNGUÍA

MÉXICO, D.F.

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ***Agradecimientos***

*Al Instituto Nacional de Cardiología "I Ch", Departamento de Farmacología, por el apoyo brindado para la realización del trabajo experimental del presente trabajo.*

*Al Dr. Pablo Jorge Suárez Munguía, por la dirección de esta tesis.*

*A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y al Dr. Edmundo Chávez Cossio por sus atinadas sugerencias durante los exámenes Tutorales y en la revisión de esta tesis.*

*Al Dr. Rolando Hernández Muñoz por sus comentarios, por su apoyo y el tiempo concedido para la realización de este trabajo.*

*A la Dra. Martha Franco Guevara, a la Dra. María Luisa Fanjul Peña, a la Dra. Guadalupe Baños de MacCarthy, y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de este texto.*

*A Delia, Edgar y Juan Antonio por el apoyo brindado en mi incursión por el mundo de las computadoras.*

*A Dios agradezco, el encontrar siempre una huella en la arena.*

## INDICE

Pag.

Abreviaturas -----	3
Resumen -----	4
Introducción -----	7
• Óxido nítrico (NO) -----	9
• Acción del NO en riñón -----	10
• NO y endotelio -----	13
• Funciones biológicas del NO -----	15
• Sintasa del óxido nítrico (SNO) -----	16
• Estrés hemodinámico -----	18
• Canales iónicos activados por estiramiento -----	20
Objetivos -----	22
Hipótesis -----	23
Metodología -----	24
Cuantificación de NO -----	28
Resultados -----	30
• Gráf. 1	
Efecto del flujo sobre la curva dosis-respuesta a fenilefrina -----	30
• Gráf. 2	
Efecto de L-NAME en respuesta al flujo -----	31
• Gráf. 3	
Efecto de L-arginina en respuesta al flujo -----	32
• Gráf. 4	
Efecto de L-NAME y L-arginina a flujo de 10 ml/min -----	33

▪ Gráf. 5	
Efecto de L-NAME y L-arginina a flujo de 20 ml/min. -----	34
▪ Gráf. 6	
Curva de liberación de NO por el flujo -----	35
▪ Gráf. 7	
Efecto de Gadolinio sobre la liberación de NO -----	36
▪ Gráf. 8	
Efecto del Gadolinio sobre la presión de perfusión -----	37
▪ Gráf. 9	
Efecto de la hipertensión renal sobre la respuesta a fenilefrina ----	38
▪ Gráf. 10	
Efecto del flujo (10 y 20 ml/min) sobre la hipertensión renal -----	39
▪ Gráf. 11	
Efecto del L-NAME sobre la hipertensión renal -----	40
Discusión -----	41
Conclusión -----	48
Referencias -----	49

## **ABREVIATURAS**

AcCh	Acetilcolina
CEV	Célula endotelial vascular
CIAE	Canales iónicos activados por estiramiento
EF	Estrés por fricción
PF	Presión por flujo
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
L-NAME	Metil éster de L-nitroarginina
MetHb	Metahemoglobina
NO	Óxido nítrico
SNO	Sintasa del óxido nítrico
SNOc	Sintasa del óxido nítrico constitutiva
SNOi	Sintasa del óxido nítrico inducible
SNO <sub>n</sub>	Sintasa del óxido nítrico neuronal
HbO <sub>2</sub>	Oxihemoglobina
PP	Presión de perfusión

## **RESUMEN**

Las evidencias indican que las fuerzas hemodinámicas del flujo sanguíneo, estrés por fricción y deformación por presión son señales reguladoras del tono vascular por la liberación de los factores de relajamiento derivados de endotelio. Se sabe que las fuerzas hemodinámicas que actúan en el endotelio vascular causan: 1) liberación de agentes vasoactivos tales como prostaciclina (PG)<sub>I<sub>2</sub></sub>, purinas relajantes derivadas de endotelio además de factores de constricción, y 2) activación de los canales iónicos selectivos a Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>. Esto sugiere que la membrana celular endotelial contiene estructuras de naturaleza desconocida que pueden actuar como sensores de flujo y de presión. El óxido nítrico (NO) puede ser el mayor mediador de la dilatación inducida por el flujo.

La óxido nítrico sintasa utiliza L-arginina como el sustrato para producir óxido nítrico y es inhibida por el análogo metil éster de N<sup>6</sup>-nitro-L-arginina (L-NAME). Se demostró una modulación de la respuesta adrenérgica por el flujo en la arteria carótida perfundida de conejo. En adición la perfusión de L-NAME incrementa la respuesta a vasoconstrictores tales como la fenilefrina al realizar una curva de presión en el riñón de rata perfundido, sugiriendo que no es liberado en respuesta a vasoconstrictores y flujo en el lecho renal aislado, por otra parte se ha reportado recientemente que el L-NAME falla para alterar la curva de flujo-presión en la vasculatura mesentérica aislada; sin embargo no hay datos hasta la fecha en estos trabajos indicando cambios en la producción y liberación de óxido nítrico.

La participación de óxido nítrico en la patofisiología de la hipertensión está bien aceptada, sin embargo las alteraciones de la modulación del tono de la vasculatura muscular lisa por el flujo, durante la hipertensión, ameritará estudios futuros.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) estudiar si la respuesta al agonista adrenoreceptor, fenilefrina es modulada por el flujo en el lecho vascular renal intacto, 2) estudiar el papel del óxido nítrico bajo el efecto del flujo en la respuesta vascular utilizando el L-NAME o la L-arginina, 3) comparar la respuesta vascular renal en ratas normales e hipertensas, y 4) investigar el mecanismo por medio del cual el flujo estimula la liberación de óxido nítrico.

La hipótesis planteada es que el tono vascular renal se mantiene por el equilibrio de la acción de factores dilatadores y constrictores en el flujo sanguíneo debido un estímulo constante que promueve la liberación de factores liberadores y constrictores para modular el tono vascular. Uno de estos factores puede ser el óxido nítrico. Por lo tanto, si se mide la liberación de este gas por el riñón, pueden observarse cambios en la concentración inducida por el flujo.

La solución de bicarbonato Krebs-Ringer se utilizó para la perfusión de los riñones de ratas normales y de hipertensas, la presión de perfusión se monitoreó continuamente por medio de un sensor conectado a un polígrafo

Las curvas de dosis respuesta fueron obtenidas por la administración de bolos de fenilefrina a diferentes concentraciones, así como el L-NAME. Se realizaron cambios en el flujo de perfusión por medio de una bomba peristáltica.

Las conclusiones fueron las siguientes: 1) la respuesta vascular renal a la fenilefrina en riñones perfundidos de ratas fue modula por el flujo, 2) el flujo causa

inhibición a la respuesta a fenilefrina, 3) esta inhibición es mediada por el óxido nítrico, 4) el flujo estimula la liberación de óxido nítrico en el riñón de rata perfundido ,y 5) la respuesta vascular al flujo es diferente en la hipertensión, aunque la liberación de óxido nítrico es normal, y 6) la respuesta al bloquear los canales iónicos activados por estiramiento con gadolinio produjo inhibición de la liberación de óxido nítrico estimulada por el flujo, provocando además un aumento importante en la resistencia vascular.

Una conclusión general es que en el riñón, el flujo regula el tono vascular por estimulación de la producción de óxido nítrico y esta estimulación es mediada por la activación de los canales iónicos activados por estiramiento.

## **INTRODUCCIÓN**

El lumen de los vasos sanguíneos se encuentra recubierto por una capa de células que en conjunto se denomina endotelio, esta cubierta provee una amplia superficie para el intercambio de los fluidos y solutos entre la sangre y el tejido vascular. El endotelio no sólo sirve como una barrera pasiva, como se le consideró durante mucho tiempo, hasta que los experimentos pioneros de Furchgott y Zawadzky en 1980 <sup>(1)</sup> demostraron que es esencial mantener al endotelio intacto para producir vasorelajación en presencia de acetilcolina (AcCh) en arterias aisladas. Estudios posteriores revelaron que la AcCh estimula la liberación de un potente vasodilatador producido por el endotelio al que identificaron como óxido nítrico (NO) <sup>(2)</sup>.

Las células del endotelio (CEV) juegan un papel crítico en la homeostasis vascular por las diversas funciones que realizan sensando e integrando la hemodinamia, los estímulos hormonales y el efecto de las alteraciones en la función vascular a través de diversas proteínas y moléculas mediadoras <sup>(3)</sup>. Como resultado de estas propiedades, las CEV modulan procesos relacionados con la pared del vaso sanguíneo incluyendo regulación de los procesos inflamatorios <sup>(4)</sup>, en la permeabilidad de lipoproteínas del plasma, adhesión de leucocitos y liberación de factores protrombóticos y antitrombóticos, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas <sup>(5)</sup>.

En los últimos años se han acumulado evidencias en la literatura que nos indican la participación activa del endotelio en procesos fisiológicos y patológicos <sup>(6,7)</sup> al liberar sustancias vasoactivas como prostaciclina, adenosina, ON, endotelina <sup>(8)</sup>, factor de hiperpolarización derivado de endotelio <sup>(3,9)</sup>, ATP, acetilcolina, sustancia P, interleucina 6, histamina, el activador tisular del plasminógeno y otras.

El NO, en particular, participa en numerosas acciones biológicas en el organismo como la adhesión de leucocitos al endotelio <sup>(10,11)</sup>, proliferación de células en el músculo liso <sup>(7)</sup> y en la agregación plaquetaria <sup>(7)</sup>; también se reconoce su papel como mensajero en procesos neuronales <sup>(12)</sup>. La alteración en la producción de NO lleva a procesos patofisiológicos como aterosclerosis <sup>(13)</sup>, hipertensión arterial <sup>(14)</sup>, hipertensión pulmonar <sup>(15)</sup>, hipercolesterolemia <sup>(7,16)</sup> y diabetes melitus <sup>(16)</sup>.

En el riñón, el NO interviene en el control de la hemodinámica glomerular, <sup>(17,18)</sup>, en mecanismos que inducen proteinuria, trombosis mesangial e infiltración de leucocitos <sup>(19)</sup>.

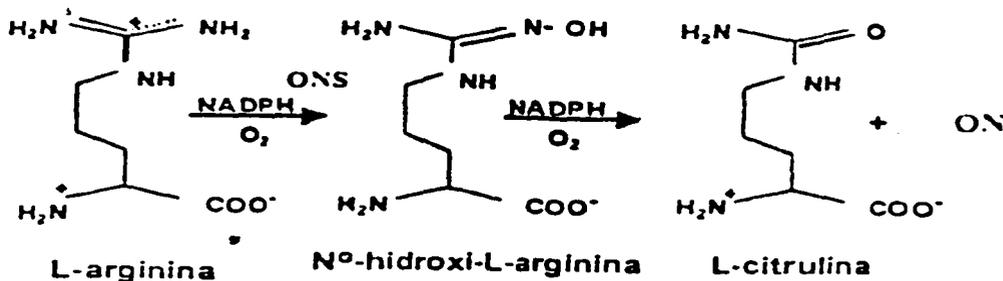
El las últimas décadas se ha avanzado en el conocimiento de los procesos mediados por las sustancias vasoactivas derivadas del endotelio <sup>(2,3,6,20,21)</sup> y se han propuesto algunas vías de transducción de la señal física provocada por el flujo sanguíneo a señal química dentro de la célula <sup>(2,22,23)</sup>, confiriendo al endotelio la característica de tejido ampliamente especializado y no sólo de barrera física. Sin embargo, se requiere de amplios estudios para explorar los mecanismos a través

de los cuales ejercen su acción las fuerzas físicas del flujo vascular como el estrés por fricción y la deformación celular por presión <sup>(24,25,26)</sup>.

## ÓXIDO NÍTRICO

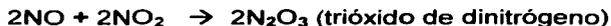
El óxido nítrico se forma cuando el grupo guanido del aminoácido esencial L-arginina es oxidado por cinco electrones, dando lugar a óxido nítrico y a L-citrulina (Moncada and Higgs 1991)<sup>(4)</sup>. La reacción es catalizada por un grupo de enzimas llamadas sintasa del óxido nítrico (SNO) y muchos cofactores. La reacción es estereoespecífica de tal manera que es la L-arginina y no la D-arginina, la molécula que rompe la SNO para formar la L-citrulina <sup>(4)</sup>

Fig. 1: Biosíntesis de Oxido Nítrico <sup>(39)</sup>



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El óxido nítrico es una molécula relativamente inestable en presencia de oxígeno y puede auto-oxidarse rápida y espontáneamente en una variedad de nitrógenos oxidados :



El dióxido de nitrógeno y el trióxido de nitrógeno son potentes agentes con habilidad para nitrosar una variedad de aminas primarias y secundarias, las cuales pueden producir potencialmente nitrosaminas carcinogénicas y/o promueve mutagénesis por desaminación en las bases del ADN.

### **Acción del óxido nítrico en el riñón**

El óxido nítrico derivado de endotelio tiene un papel importante en la regulación renal, la hemodinámica y función excretora . La bradisinina y la AcCh inducen la vasodilatación incrementando la síntesis de NO, llevando a un aumento en la diuresis y natriuresis <sup>(18)</sup>.

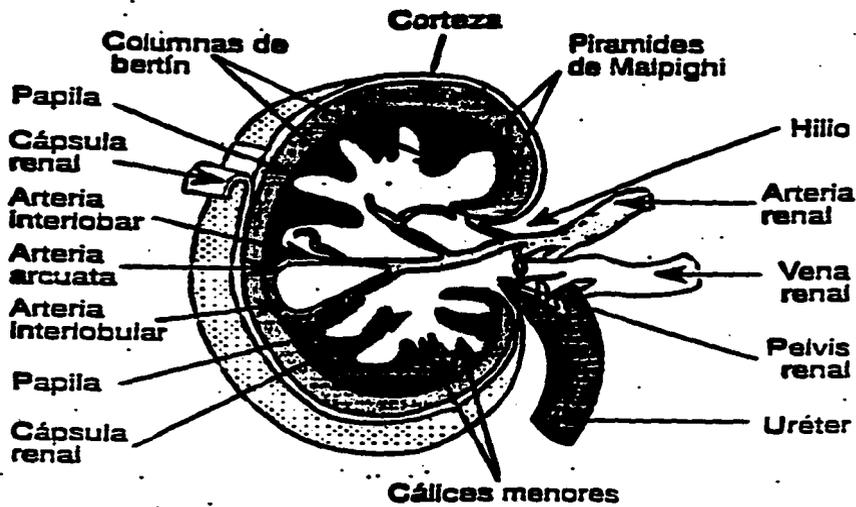
En el riñón el NO generado por la SNOc participa en la regulación de la microcirculación glomerular modificando el tono vascular de las arteriolas aferentes y en las células mesangiales.

Mientras que el NO formado por la mácula densa y las arteriolas aferentes controlan la hemodinámica glomerular por vía del factor de crecimiento transformante (TGF) y por la modulación en la liberación de la renina <sup>(18)</sup>.

Por lo tanto el NO es importante en la regulación fisiológica de la presión sanguínea del capilar glomerular, del flujo glomerular y del coeficiente de ultrafiltración glomerular. Por medio de estas acciones en los flujos y presiones glomerulares, el NO puede regular el tráfico micro y macroglomerular a través del mesangio<sup>(18)</sup>.

La insuficiencia crónica del NO causa hipertensión y daño glomerular y puede estar involucrado en la génesis de hipertensión dependiente de sales. Incrementos en la producción de NO pueden llevar a la patogenia de los primeros cambios hemodinámicos en la diabetes y en la respuesta hemodinámica fisiológica en el embarazo normal.

Cuando se bloquea la síntesis de NO basal se provoca un decremento en el flujo sanguíneo renal y en la excreción de sodio <sup>(19)</sup>



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 2 : Sección longitudinal de un riñón: estructura interna y vascularización.

## **Óxido nítrico y endotelio**

Las CEV producen óxido nítrico en respuesta a una variedad de estímulos mecánicos así como por autacoides y hormonas locales y circulantes. Se ha considerado al NO como un potente vasodilatador endógeno el cual presenta acciones similares a la nitroglicerina y al nitroprusiato sódico.

La L-arginina-NO se encuentra en el tejido vascular y en diferentes células siendo considerado como un mecanismo general de comunicación intercelular para la activación de la guanilato ciclasa.

Las isoformas constitutivas de SNO dependientes de calcio implican que puede existir una relación significativa entre los receptores de los neurotransmisores que causan un incremento en los niveles de calcio intracelular y la generación de NO. Un significativo subgrupo de la superfamilia de proteínas G acopladas a receptores (GPCRs) activan la fosfolipasa C, como una de las primeras etapas de la traducción de señales mediada por receptores. El resultado de la cascada de señalización intracelular involucra un incremento de hidrólisis del fosfoinositol y un incremento subsecuente en los niveles del calcio citosólico <sup>(27)</sup>.

El efecto de glutamato sobre la regulación vía receptores ionotrópicos están bien caracterizado. El glutamato actúa sobre receptores metabotrópicos a glutamato, los cuales están acoplados a la hidrólisis del fosfoinositol y la movilización del calcio intracelular y se ha visto también que activa a la SNO de acuerdo a los niveles presentes de GMPc.

Significativamente, la respuesta de GMPc vía receptores metabotrópicos a glutamato parecen ser dependiente tanto de fuentes de calcio intracelular como de influjos de calcio extracelular, en tanto que los mediados por receptores ionotrópicos son dependientes solo del calcio extracelular <sup>(27)</sup>. Un estudio posterior de Bhardwaj <sup>(27)</sup> confirmó esta finalidad y sugirió la liberación de calcio intracelular como un mecanismo de amplificación de la activación de SNO.

El papel celular del NO como un activador de la enzima guanilato ciclasa está bien establecido, resultando en un incremento dependiente de la concentración. Muchos de los efectos fisiológicos del NO pueden estar ligados a acciones subsecuentes de los nucleótidos. En el músculo liso, la secuencia en las etapas de fosforilación de las proteínas, o de la modulación de canales iónicos, mediados por GMPc resulta en la relajación de este tejido <sup>(27)</sup>.

Una lista aún no precisada de neurotransmisores y autacoides, incluyendo acetilcolina, noradrenalina, serotonina, substancia P, adenosintrifosfato, bradicinina e histamina, que actúan a través de GMPc, y causan vasodilatación, promoviendo la liberación del NO del endotelio. La vasodilatación mediada por el NO se mantiene predominantemente por estímulos mecánicos, tales como el estrés por fricción y el flujo pulsátil en los vasos vasculares, en la regulación hormonal por los agentes antes mencionados <sup>(27)</sup>, además de la intervención farmacológica que resulta en la activación de GPCRs ligados a la síntesis de NO, que llevan a modular el tono vascular endógeno.

## **Funciones biológicas del óxido nítrico**

Al óxido nítrico se le considera como una molécula participante en un gran número de eventos biológicos <sup>(28)</sup>. Uno de estos papeles muy bien establecido es el control del tono vascular, dependiente de endotelio y producido por el relajamiento de la musculatura lisa vascular y mediado por el aumento en la formación del guanosín monofosfato cíclico (GMPc).

El óxido nítrico también puede mediar la relajación de la musculatura lisa vascular de una manera independiente de endotelio en las arterias cerebrales y en otras arterias <sup>(24)</sup>.

En el cerebro, el NO actúa como un mensajero mediante la acción del glutamato que activa a los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA) <sup>(24)</sup>. Evidencias recientes sugieren que se produce un exceso de NO cuando hay daño neuronal posterior a un traumatismo. Se ha sugerido que el NO puede modular tanto la reacción inflamatoria aguda como la crónica <sup>(28)</sup>

Dentro de las aplicaciones médicas podemos referirnos a la hipotensión, siendo esta una alteración provocada por una producción excesiva de NO que lleva al paciente a un choque séptico. La inhibición de la SNO resulta en un incremento en la presión sanguínea, en un choque séptico que nos lleva a determinar su efecto en la mortalidad <sup>(29)</sup>.

La inhalación de óxido nítrico puede ser benéfica durante el síndrome de distresia respiratoria. El NO es un vasodilatador pulmonar, que puede ser inhalado por una máquina de perfusión, generando una vasodilatación selectiva

de alveólos de la pared pulmonar <sup>(6)</sup>. El NO o compuestos donadores de NO se han propuesto como terapia para la hipertensión pulmonar.

### **Sintasa del óxido nítrico**

La SNO existe en tres isoformas, lo cual es importante por las variaciones en la actividad de esta enzima. En las CEV existe la sintasa del óxido nítrico constitutiva III (SNOc tipo III), que es expresada constitutivamente; la enzima migra como un monómero de 135 Kda y mantiene un alto grado de homología con la citocromo P-450 reductasa. Es una enzima que mantiene una producción basal de pequeñas cantidades de NO, sin embargo también se ha identificado en una gran variedad de células no endoteliales, lo que indica la producción de NO por estas células<sup>(30)</sup>.

La SNO neuronal (SNO<sub>n</sub>) es una SNO tipo I, que también es constitutiva, se expresa predominantemente en el tejido neuronal; es una enzima calcio dependiente y produce cantidades picomolares de NO. La similitud no es sorpresiva dado que estas proteínas presentan un 60 % de homología <sup>(30)</sup>

Una forma inducible de SNO (SNO<sub>i</sub>), del tipo II, está expresada en una variedad de tejidos y órganos en adición al endotelio vascular. En contraste con la SNOc o a la SNO<sub>n</sub>, la SNO<sub>i</sub> no se expresa en la mayoría de los tejidos pero es

inducida por lipopolisacáridos bacteriales (LPS) o citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral, interleucina e interferón <sup>(30)</sup>.

Aunque su mecanismo de activación es diferente a la SNOc, la SNOi parece tener un 50 % de homología con la SNOc o con la SNO<sub>n</sub>. La inducción de SNOi da como resultado la formación de grandes cantidades (1000 veces) de NO por periodos largos comparada con SNOc o con la SNO<sub>n</sub>.

La asignación del término “constitutivo” para la expresión de SNOc y SNO<sub>n</sub>, se refieren a una rápida activación en respuesta para un apropiado señalamiento intracelular (ej., calcio), en contraste para SNOi, donde la señal ej., citocinas) representa un disparo inicial para la síntesis de proteína de novo. Sin embargo, la SNOc y SNO<sub>n</sub> existen como una expresión constante, y esto no implica que no haya una regulación a tiempo largo <sup>(29)</sup>.

Se ha demostrado por gran número de estudios, el papel fisiológico del incremento en la actividad de ambas isoformas constitutivas en varias condiciones.

Cambios en la regulación de la expresión de las isoformas constitutivas de NOS están asociadas con una variedad de condiciones patofisiológicas. Por ejemplo, la disfunción endotelial prolongada, asociada con hipertensión, se ha mostrado que coincide con una activación SNOe y producción de aniones de superóxido <sup>(29)</sup>. Los incrementos en NO endógeno y O<sup>2-</sup>, pueden resultar en una combinación de grandes cantidades de potentes sustancias oxidantes dañinas, tales como peroxinitritos.

## **Estrés hemodinámico**

Las CEV experimentan tres fuerzas mecánicas primarias que son:

**Presión:** Creada por fuerzas hidrostáticas dentro del vaso sanguíneo.

**Estiramiento circular o tensión:** Es el resultado de conexiones intercelulares definidas en las CEV, ejerciendo fuerzas longitudinales sobre las células durante el movimiento vascular.

**Estrés por fricción:** Generada por el rozamiento del flujo sanguíneo sobre el lumen del vaso sanguíneo.

De estas fuerzas de presión, el estrés por fricción (EF) es una fuerza particularmente importante debido a su acción estimulante en la liberación de sustancias vasoactivas, cambios en la expresión génica <sup>(26)</sup>, en la morfología y metabolismo celular <sup>(21)</sup>.

Se sabe que el EF actúa a través del endotelio para regular tanto el tono vascular agudo del vaso sanguíneo durante la embriogénesis y crecimiento de un nuevo vaso, como en la restructuración crónica del vaso sanguíneo <sup>(31,32)</sup>

El EF causa una deformación de las CEV hacia la dirección del flujo sanguíneo <sup>(22)</sup> disminuyendo la resistencia efectiva y reduciendo el EF <sup>(33)</sup> determinado por la viscosidad de la sangre <sup>(3,21)</sup>, las dimensiones del vaso sanguíneo <sup>(31)</sup> y el grado de fluidez dando como resultado una fuerza tangencial sobre la CE por unidad de área <sup>(24)</sup> que se transmite hacia las células vecinas y hacia el interior de la célula provocando una respuesta bioquímica <sup>(3,31,34)</sup>.

Los mecanismos por medio de los cuales la célula responde al EF comienza a dilucidarse y se han propuesto algunas estructuras de la membrana endotelial que intervienen en este proceso <sup>(29)</sup> como sensores del estrés hemodinámico:

- Receptores acoplados a proteína G <sup>(3,34)</sup>
- Adhesiones focales <sup>(3)</sup>, integrinas <sup>(26)</sup>
- Proteínas integrales de membrana <sup>(25)</sup>
- Receptores a cinasas <sup>(34)</sup>
- Canales iónicos sensibles a estiramiento <sup>(35,36,37)</sup>
- Alteraciones del citoesqueleto celular <sup>(38)</sup>

Los cambios en la hemodinamia de los fluido captados por los sensores anteriormente propuestos llevan a una cascada de señalamiento intracelular, a través de eventos de fosforilación o de generación de especies reactivas de oxígeno, que promueven diversos efectos tales como la liberación de citocinas y otros mediadores, activación de factores de transcripción, alteración de genes y de expresión de proteínas que alteren la división celular o conducen a la muerte <sup>(22)</sup>.

## **Canales iónicos activados por estiramiento**

El sensor endotelial de flujo que proponemos en el presente trabajo son los canales iónicos activados por estiramiento y se sabe que están presentes en el endotelio de algunos órganos <sup>(35,37,39, 40)</sup>.

Son canales de la membrana celular sensibles a estiramiento que funcionan como microsensores endoteliales para los cambios en el ambiente hemodinámico, traduciendo el estrés físico en señales químicas como el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulación del volumen celular <sup>(39)</sup>, síntesis del ADN y alteraciones en la conductancia eléctrica del corazón <sup>(37)</sup>.

Existen dos tipos de CIAE: uno selectivo a K, participa en la polarización de la membrana y los no selectivos que permiten la entrada de Na,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  <sup>(36,39)</sup>.

Los CIAE se han descrito en las células endoteliales vasculares <sup>(39,41)</sup> cardiomiocitos <sup>(40)</sup>, células de la musculatura lisa vascular<sup>(37)</sup>, así también se les han encontrado en las membranas celulares de algunas plantas, bacterias y animales <sup>(37)</sup>.

En los estudios realizados por Hutchison 1996 <sup>(38)</sup> se propone que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula y la hiperpolarización son los estímulos que se requieren en el endotelio vascular para provocar liberación de NO.

Los CIAE pueden ser bloqueados con Gadolinio <sup>(36,42)</sup> a concentración de 3  $\mu\text{M}$ , como lo reporta Xian-Cheng Yang y cols. <sup>(36)</sup>, en estudios realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando técnicas de Patch Clamp. Se encontró que el  $\text{Gd}^{3+}$  es el bloqueador más potente en concentraciones entre 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , y que los lantánidos lutenio y lantano también los pueden bloquear pero a concentraciones mayores de 100  $\mu\text{M}$ .

Otra de las características que tiene el  $\text{Gd}^{3+}$  es que su acción desaparece a los 30 seg, después de su aplicación cuando se utiliza a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ , y su bloqueo es reversible después de ser eliminado <sup>(36)</sup>.

Ya que los CIAE se encuentran en la membrana de las CEV, pueden ser uno los mecanosensores de las fuerzas físicas del flujo hemodinámico, que al inducir la hiperpolarización de la membrana por el flujo de iones como el  $\text{K}^+$ , participan en el mecanismo de liberación del ON al aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula <sup>(42)</sup>.42

En el presente trabajo se estudió la posibilidad de la participación de los CIAE como un mecanismo de liberación de NO por el estrés hemodinámico en vasos de resistencia en el modelo de riñón aislado y perfundido.

## **OBJETIVOS**

**Los objetivos de este trabajo fueron:**

- 1) Estudiar si la respuesta al agonista adrenoreceptor fenilefrina, es modulada por el flujo en el lecho vascular renal intacto.**
  
- 2) Estudiar el efecto del flujo sobre la producción de óxido nítrico dentro de la respuesta vascular utilizando L-NAME o L-arginina.**
  
- 3) Valorar el efecto del cloruro de gadolinio para evaluar la participación de los canales activados por estiramiento en los efectos del flujo.**
  
- 4) Comparar la respuesta de la vasculatura de riñones obtenidos de ratas normales y la de ratas hipertensas.**

## **HIPOTESIS**

- 1) El tono vascular renal se mantiene por el equilibrio de la acción de factores dilatadores y constrictores. El flujo sanguíneo, que es un estímulo constante, promueve la liberación de factores dilatadores y constrictores para modular el tono vascular. Uno de estos factores puede ser el óxido nítrico. Por lo tanto, si se mide la liberación de este gas por el riñón, pueden observarse cambios en su concentración inducidos por el flujo.
  
- 2) Dado que el flujo sanguíneo promueve la liberación de factores relajantes y constrictores, puede modificar la acción farmacológica de sustancias constrictoras como es la fenilefrina.
  
- 3) Uno de los mecanismos de acción del flujo es la activación de canales sensibles a estiramiento. Si estos canales participan en la modulación del tono vascular renal, la aplicación de un bloqueador de estos canales podría modificar las respuestas al flujo.
  
- 4) En situaciones patológicas como la hipertensión renovascular, la regulación del tono vascular está alterada y por lo tanto la respuesta a vasoconstrictores mediada por el flujo podría estar modificada.

## **METODOLOGÍA**

Se utilizó el modelo de riñón aislado y perfundido mediante el método de Langendorff a flujo de perfusión constante. Los animales de experimentación fueron ratas Wistar macho de 250 a 270 g. de peso, anestesiadas con pentobarbital (0.1ml/100g) por vía intraperitoneal y se les mantuvo con ventilación artificial hasta canular la arteria mesentérica renal izquierda, disecando el riñón y conectando la cánula de inmediato al perfusor.

El líquido de perfusión fue una solución de Krebs a pH 7.4 controlada por un recirculador térmico a 37°C. Durante el experimento, este líquido se burbujeó con una mezcla de carbógeno (5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>) y la velocidad de perfusión se controló mediante una bomba peristáltica. La respuesta vascular renal fue monitoreada por un transductor de presión conectado a un Polígrafo (Fig. 4)

Una vez que el riñón se encuentra conectado a la cánula de perfusión el experimento consta de:

- Un periodo de estabilización de 30 min para que el riñón se adapte a las nuevas condiciones de perfusión de 10ml/min y 20ml/min.
- Se utilizaron grupos experimentales en donde cada riñón fue su propio control n=5 y p< 0.05 para cada experimento.

Cada una de las series consta de una curva control con variaciones en la velocidad de perfusión de 5 ml/min a 25 ml/min a intervalos de 2 ml/min, con un tiempo de 2 min para cada intervalo; y una curva experimental con las mismas variaciones en presencia o ausencia de los fármacos utilizados. Los fármacos se aplicaron mediante una bomba de infusión continua (0.01 ml/min) a la solución de perfusión antes de entrar a la arteria renal.

En cada experimento se registró la presión de perfusión por medio de un polígrafo y con los registros de perfusión se calcularon los valores de resistencia vascular en la siguiente relación ,  $RV = P/F$  siendo RV la resistencia vascular, P es la presión de perfusión (PP) dada en mm de Hg y F es la velocidad de flujo en ml/min <sup>(52)</sup>.

Se cuantificó el óxido nítrico presente en el perfusado efluente del riñón por medio de la técnica de reducción de oxihemoglobina ( $HbO_2$ ) a metahemoglobina (MetHb por el efecto redox del NO que se libera <sup>(51)</sup>. En cada velocidad de perfusión se tomaron muestras del líquido efluente del riñón y se analizaron por espectrofotometría en la región visible, a un coeficiente de extinción de 401-411 nm. La  $HbO_2$  es un conformero funcional bioactivo de la hemoglobina y tiene una elevada afinidad por el NO (menos de 100 ms) que lo reduce a MetHb <sup>(51)</sup>. La MetHb es estable en condiciones experimentales óptimas de 37°C y saturación de  $O_2$ , lo cual la hace cuantificable.

La reacción que se efectúa es la siguiente:



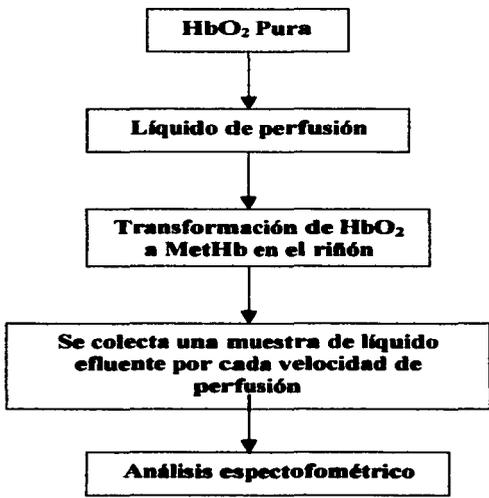
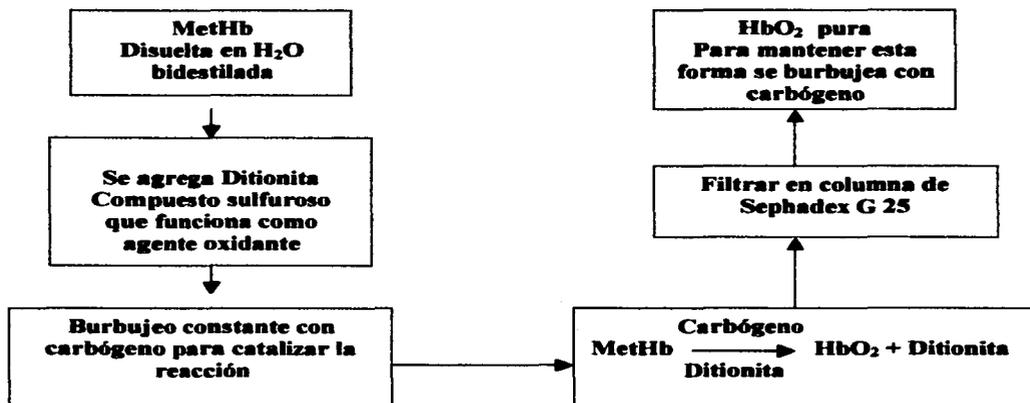
La técnica utilizada para inducir la hipertensión renal en las ratas consiste en ligar con una grapa la arteria renal derecha provocando hipertensión e isquemia en el riñón derecho. Para los experimentos se utilizó el riñón izquierdo que presenta hipertensión más no tiene isquemia.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó con ANOVA y está expresado como la media  $\pm$  el error estándar. Para la determinación de la significancia estadística de nuestros resultados, se utilizó la prueba de t de Student donde los valores con una  $P \leq 0.05$  se consideran estadísticamente significativos.

**Fármacos y concentraciones utilizados en las curvas de flujo.**

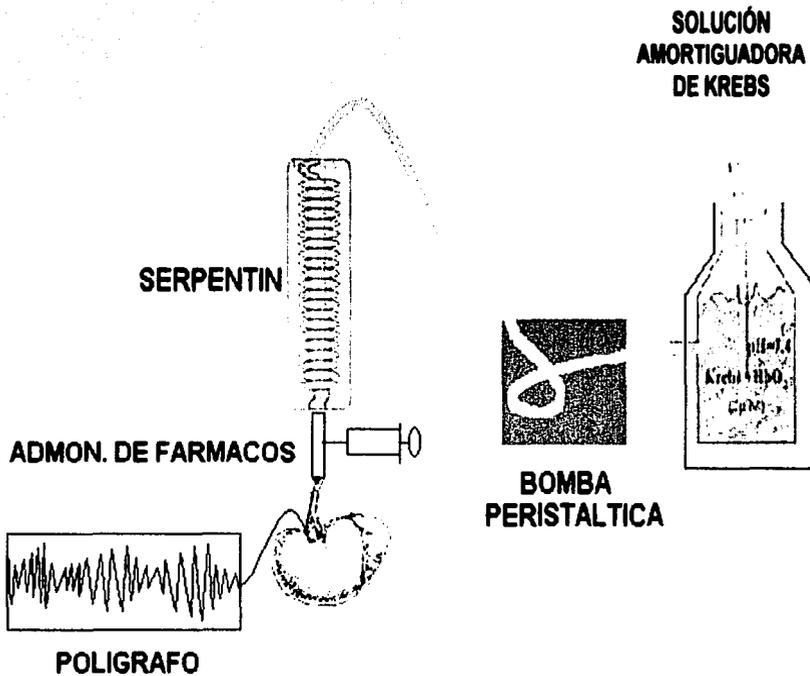
<b>Nombre</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Acción</b>
Fenilefrina	FE	1-100 $\mu$ M	Vasoconstrictor adrenérgico
L-Arginina	L-Arg	5mM	Sustrato de la ONS
metil-éster de N <sup>w</sup> -nitro-L-arginina-	L_NAME	100 $\mu$ M	Inhibidor específico De la ONS
Gadolinio	Gd <sup>3+</sup>	3 $\mu$ M	Inhibidor de NO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

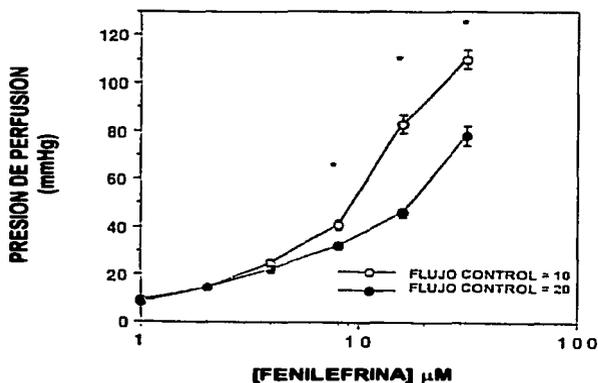
**Fig. 3 Obtención de HbO<sub>2</sub> <sup>(51)</sup>**



**Fig. 4: Sistema de Langendorff**

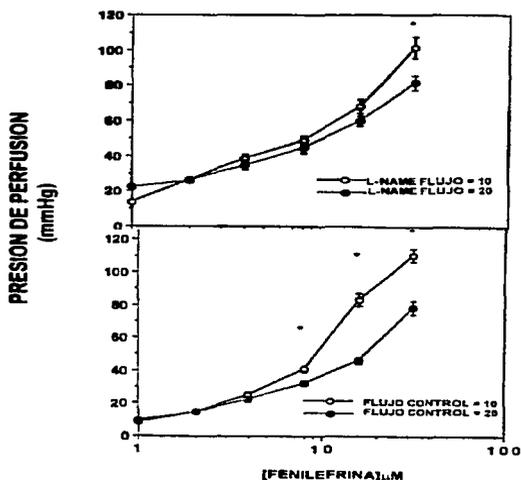
## RESULTADOS

En el riñón, como en otros órganos, la respuesta vascular a las sustancias vasoactivas reguladas por el flujo mantienen el equilibrio homeostático. En el presente trabajo se estudió la respuesta renal a vasoconstrictores adrenérgicos como es el caso de la fenilefrina en una curva dosis-respuesta, utilizando concentraciones de  $1\mu\text{M}$  hasta  $100\mu\text{M}$  de fenilefrina y midiendo la presión de perfusión (PP) que es un índice de la resistencia vascular. Cuando el flujo de perfusión (FP) cambia de  $10\text{ ml/min}$  a  $20\text{ ml/min}$ , la curva de presión de perfusión se desplazó hacia la derecha comparada con la curva control, lo cual sugiere que el efecto del estrés físico del flujo provoca la liberación de algún factor o factores relajantes por el endotelio vascular que atenúan el efecto constrictor de la fenilefrina a flujo alto (gráfica 1;  $n = 5$ ,  $p < 0,05$  utilizando como control el mismo riñón experimental).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Graf. 1:** Efecto del flujo en la curva dosis-respuesta a fenilefrina.

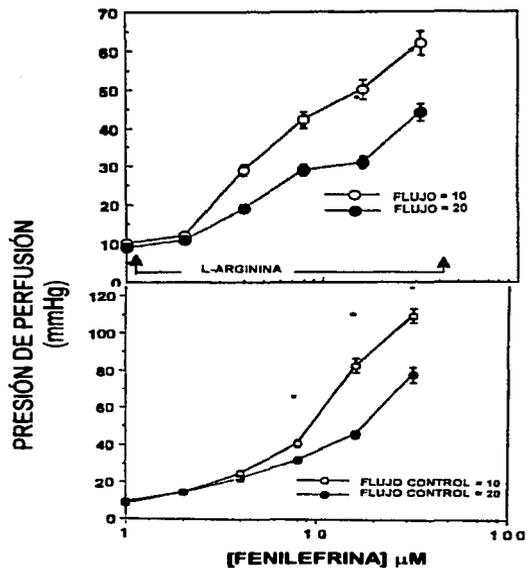


TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Graf. 2:** Efecto de L-NAME en respuesta al flujo. El inhibidor de la SNO bloquea el efecto estimulador del NO.

Para investigar si el NO es una de las sustancias vaso relajantes que se liberan por la acción del flujo, se utilizó al bloqueador del NO, el L-NAME con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  inyectada por medio de una bomba de infusión en la solución de Krebs mediante la cual se mantuvo el riñón en perfusión constante en una curva dosis-respuesta con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ).

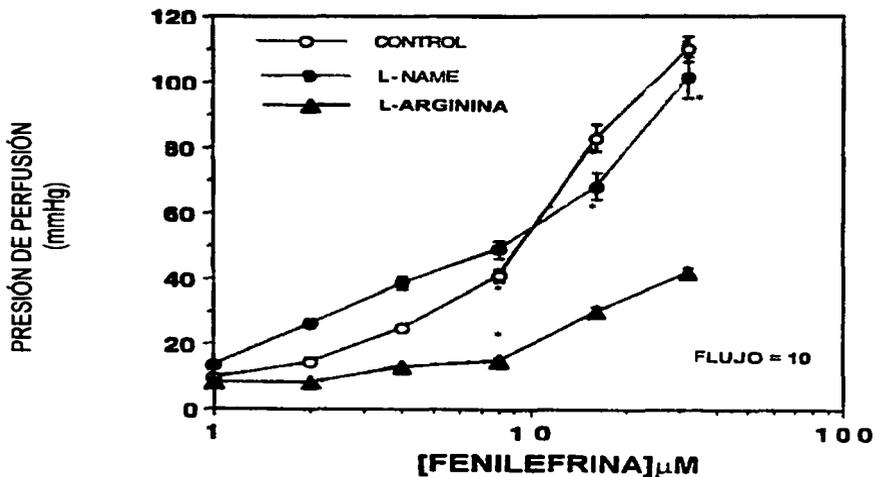
En la gráfica 2 se muestra el efecto del L-NAME sobre el NO evitando su acción relajante aún después de aumentar el FP de 10ml/min a 20 ml/min. En esta última velocidad de perfusión si existe un pequeño efecto de relajación comparada con la gráfica 1. ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ )



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Graf. 3:** Efecto de la L-arginina en respuesta al flujo

En la gráfica 3 se muestra la curva dosis-respuesta a fenilefrina cuando se utiliza el sustrato del NO, la L-arginina, para estimular la síntesis de NO y potenciar el efecto vasorelajante del flujo. Como podemos observar si existe un aumento de este efecto relajante. (n = 5, p < 0.05)

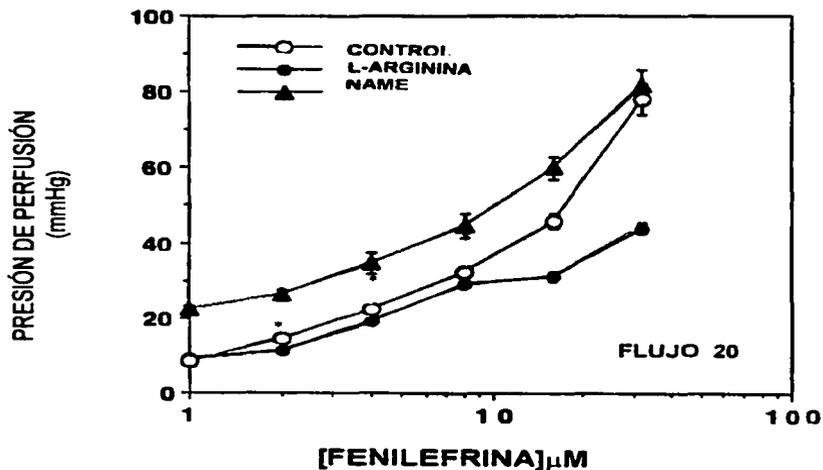


TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Graf. 4:** Efecto de la L-arginina y la L-NAME en la curva dosis-respuesta a fenilefrina a flujo de 10 ml/min.

En la gráfica 4 se muestra la curva comparativa de la L-arginina y de L-NAME a una velocidad de perfusión de 10 ml/min, observando sólo el efecto de L-arginina. Sin embargo el L-NAME no parece tener ningún efecto. ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ )

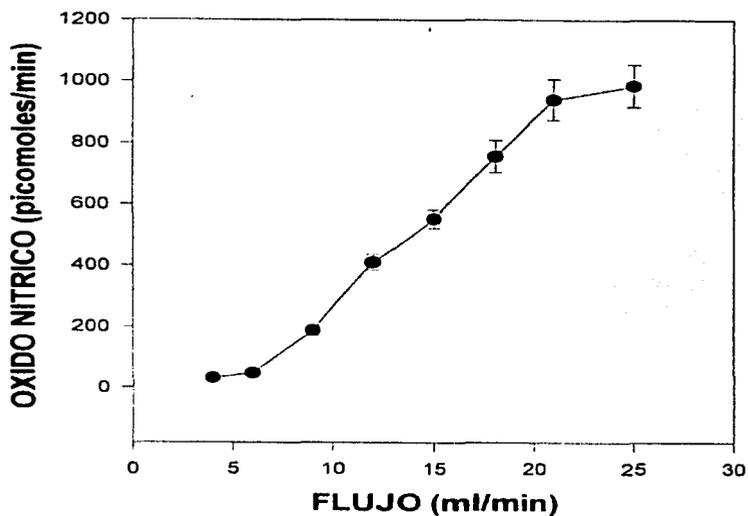
En la gráfica 5 se puede observar el efecto bloqueador de L-NAME sobre la liberación de NO que se manifiesta por un aumento de la PP al incrementar la velocidad de perfusión a 20 ml/min. El efecto de la L-arginina no es muy importante en este caso ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ).



**Graf.5:** Curva dosis-respuesta a fenilefrina con flujo de 20 ml/min.

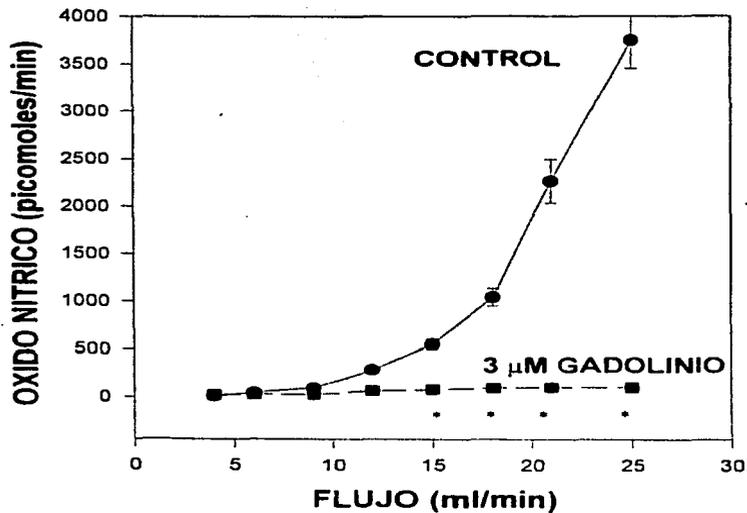
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la gráfica 6 se muestra la curva de liberación del NO con respecto al flujo de perfusión. Las muestras fueron tomadas del líquido efluente del riñón en cada velocidad de perfusión y se analizaron por espectrofotometría de UV (n =5, p <0 .05). El flujo aumenta linealmente la liberación de NO.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

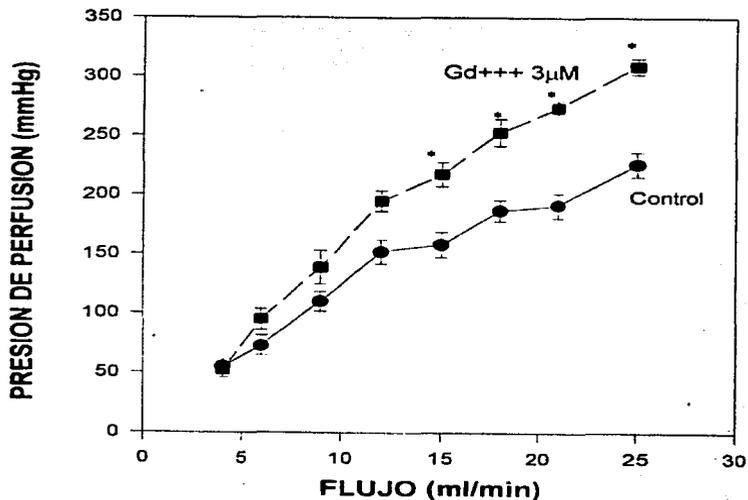
**Graf. 6:** Curva de liberación del NO con respecto al flujo.



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Graf.. 7:** Efecto del gadolinio sobre la liberación del NO.

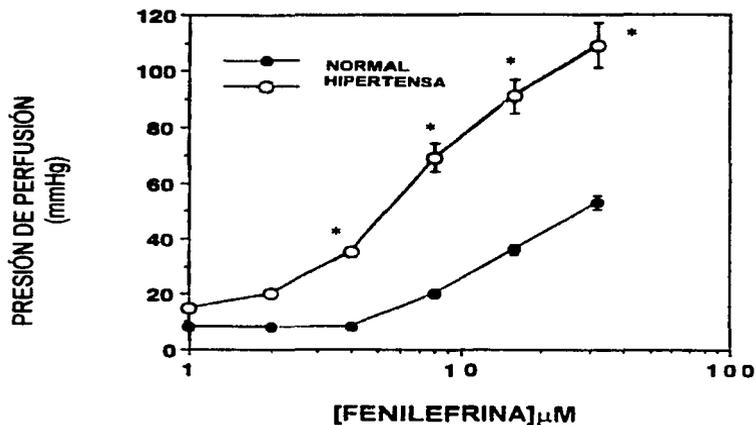
En la gráfica 7 se observa el efecto del gadolinio sobre la liberación de NO. El bloqueo de los canales iónicos activados por estiramiento inhibe completamente la liberación de NO inducida por el flujo. (n = 5, p < 0.05)



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Graf. 8:** Efecto del Gadolinio sobre la presión de perfusión.

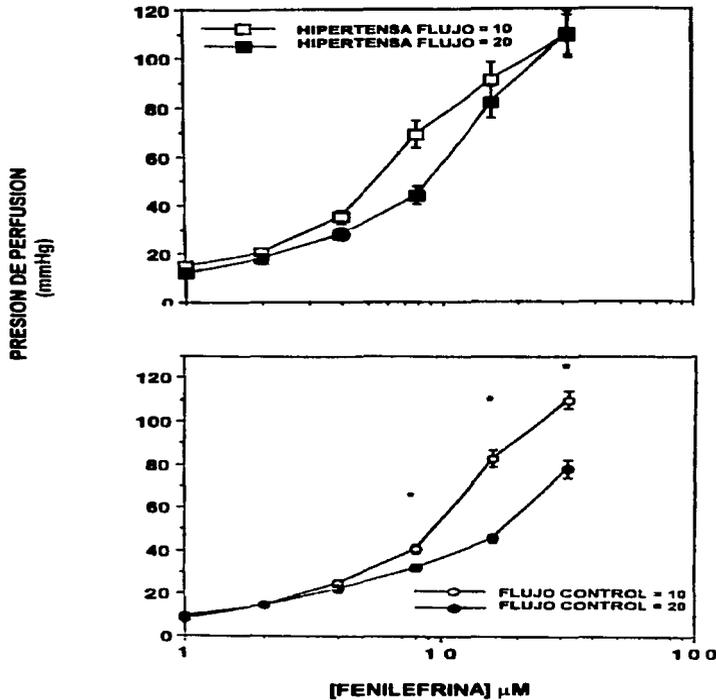
La gráfica 8 muestra el efecto del  $Gd^{3+}$  ( $3\mu M$ ) sobre la presión de perfusión renal. Observamos que la PP se incrementa con respecto a los valores control ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) demostrando que la inhibición de los CIAE y subsecuentemente, la inhibición de la liberación del NO, promueven vasoconstricción.



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Graf. 9:** Efecto de la hipertensión renal en la respuesta a fenilefrina.

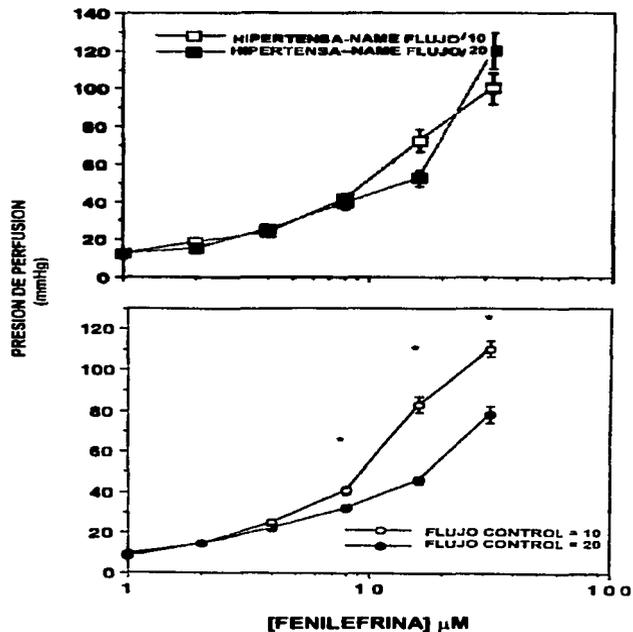
Se utilizaron ratas con hipertensión vascular renal para comprobar si los efectos antes descritos para NO se ven modificados en esta situación patológica. En la gráfica 9 mostramos que al someter al riñón no isquémico a una velocidad de perfusión de 10 ml/min y concentraciones de fenilefrina de 1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  la PP se incrementa alrededor del 60% con respecto al control (n =5, p <0.05).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Graf. 10 :** Efecto del flujo en la curva dosis-respuesta a fenilefrina en ratas con hipertensión renal a flujo de 20 ml/min.

Al aumentar el estrés de fricción en el vaso de resistencia renal por efecto del flujo a 20 ml/min encontramos que la liberación de NO está disminuida ya que en el riñón hipertenso no isquémico la curva en respuesta a fenilefrina no se desplaza a la derecha como en el riñón normal (gráfica 10; n = 5, p <0.05)



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Graf. 11:** Efecto de L-NAME en la respuesta vascular a fenilefrina en hipertensión renal.

En la gráfica 11 se observa que cuando se adiciona el L-NAME como bloqueador para el NO, no se presenta ningún cambio en la curva de PP al aumentar el flujo de perfusión a 20 ml/min en los riñones hipertensos debido a que tienen ya una vasoconstricción ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ).

## **DISCUSIÓN**

En los últimos años se han acumulado evidencias en la literatura indicando que las fuerzas hemodinámicas generadas por el flujo sanguíneo, como son el estrés por fricción y la deformación por presión, son señales reguladoras del tono vascular al promover la liberación de sustancias vasoactivas derivadas del endotelio. Así, se ha demostrado que estas fuerzas físicas, al actuar en el endotelio vascular, causan: 1) La liberación de sustancias vasoactivas como prostaciclina (prostaglandina I<sub>2</sub>), adenosina, NO, endotelina, ATP, acetilcolina, sustancia P, interleucina 6, histamina y otras <sup>(21)</sup>. Así como otros factores derivados del endotelio y 2) la activación de canales selectivos para K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> además de la activación de los canales sensibles a estiramiento <sup>(20,43)</sup>.

En el mecanismo de regulación del flujo se ha propuesto la existencia de receptores en la membrana endotelial, los cuales no han sido identificados pero pueden ser elementos del glicocalix como lo sugieren experimentos que hemos realizado en donde enzimas que hidrolizan estructuras del glicocalix previenen algunos de los efectos del flujo <sup>(44)</sup>.

Los sistemas de transducción de las señales físicas asociadas a la regulación del flujo van desde la activación de los canales iónicos, hasta la interacción con sistemas de proteína G, que incluyen la activación de recambio de

inositol fosfato. También se ha sugerido la activación de una tirosina cinasa sensible a flujo <sup>(21)</sup>.

Un incremento en el flujo puede causar dilatación arterial la cual puede ser parcial <sup>(45)</sup> o totalmente <sup>11,23)</sup> dependiente del endotelio. El óxido nítrico parece ser el mediador más importante en la dilatación producida por el flujo <sup>(21)</sup>. Este gas tan activo biológicamente, es producido por una reacción enzimática catalizada por una familia de enzimas conocida como sintasas del óxido nítrico. Estas enzimas utilizan L-arginina como sustrato para producir citrulina y óxido nítrico. La actividad de la sintasa de óxido nítrico puede ser inhibida por análogos de la L-arginina como el metil-éster de N-nitro-L-arginina (L-NAME <sup>32, 46)</sup>

Otro de los efectos del flujo que han sido reportados es la modulación de respuestas adrenérgicas en arterias carótidas de conejo <sup>(47)</sup> y otros vasos de conductancia.

La respuesta vascular a sustancias adrenérgicas o a otras sustancias es muy importante en el funcionamiento de diversos órganos, y esta respuesta en los lechos vasculares de resistencia puede determinar la presión arterial.

El riñón es un órgano que responde a infinidad de sustancias vasoactivas, que regulan su flujo sanguíneo para mantener una presión de filtración adecuada. Por esta razón el riñón es un órgano que está sometido a cambios de flujo constantemente. Además tiene un papel muy importante en la regulación de la presión arterial por medio de la liberación de una serie de sustancias vasoactivas.

El endotelio también juega un papel importante en la mediación de respuestas a dilatadores y constrictores en el riñón perfundido <sup>(48,49)</sup>. El bloqueo del NO por el L-NAME incrementa la respuesta renal a constrictores <sup>(50)</sup>.

Por estos antecedentes, nos damos cuenta que el flujo puede ser una señal física muy importante que regula el tono vascular; sin embargo, la mayoría de estudios donde se propone este papel para el flujo se han realizado en arterias de conducción y no en vasos de resistencia que serían los importantes para mantener la presión y además son los involucrados en patologías como la hipertensión arterial. Ya que menciono esta enfermedad tan frecuente en nuestro medio, cabe decir que no se sabe nada acerca de las alteraciones que se presentan en los efectos conocidos del flujo en esta condición patológica.

En este trabajo estudiamos el papel del flujo sanguíneo en la regulación del tono y de la reactividad vascular renal. Además, quisimos conocer los mecanismos por los cuales el flujo sanguíneo, a través de sus fuerzas físicas, desencadenan efectos en el endotelio y en otras células.

En el estudio de estos mecanismos incluimos tanto a la transducción de la señal física, en señal química, así como a la identificación de los posibles mensajeros que median esta respuesta. Por otra parte, también investigamos como se modifica la respuesta renal a diversos fármacos, al inducir cambios en el flujo sanguíneo del riñón. Por último, estudiamos lo que sucede con la respuesta

al flujo en la hipertensión arterial ya que, como se mencionó, no existen estudios al respecto.

La primera pregunta que tratamos de contestar, fue si el flujo era capaz de alterar la respuesta adrenal a un constrictor adrenérgico, en este caso la fenilefrina. En la gráfica 1, se observa el efecto que tiene un cambio de flujo de 10 ml/min a 20 ml/min en la curva dosis-respuesta a este fármaco en función de la presión de perfusión. El incremento de flujo provocó un desplazamiento de la curva hacia la derecha. Es decir, el aumento en la velocidad de perfusión provoca una menor sensibilidad del riñón para responder al estímulo de la fenilefrina, especialmente en flujos altos. Ya que la concentración de fenilefrina se aumentó para compensar la dilución causada al aumentar el flujo, una explicación para este fenómeno sería que el aumento de flujo liberara algún vasodilatador que contrarrestara el efecto constrictor de la fenilefrina, como podría ser el NO.

Como se ha mencionado, uno de los factores relajantes derivados del endotelio mas importante es el ON. Para estudiar la participación del NO en el efecto del flujo utilizamos al L-NAME que actúa como inhibidor de la SNO. La idea fue que al inhibir la producción de NO el efecto del flujo sería también bloqueado si este gas fuera responsable de dicho efecto. El resultado del experimento se muestra en la gráfica 2. Como se puede observar, el L-NAME bloqueó el efecto del flujo, lo que corrobora la hipótesis de este experimento y el NO es uno de los vasodilatadores que se liberan al aumentar el flujo de perfusión.

Para corroborar el efecto del NO en el flujo, en el siguiente experimento se utilizó el sustrato de la SNO, la L-arginina. En este caso se esperaría aumentar el efecto del flujo. La gráfica 3 muestra que efectivamente la arginina incrementó el efecto del flujo en 45 % haciendo menos sensible la vasculatura renal al efecto de la fenilefrina.

Un análisis más detallado de los experimentos se muestra en la gráfica 4. El efecto de la L-arginina se observa cuando el riñón se perfunde a 10 ml/min. Esto quiere decir que se puede aumentar grandemente la producción de NO. Sin embargo, el L-NAME no parece tener ningún efecto. Esto puede deberse a que la producción basal de NO a este flujo es baja.

Cuando el riñón se perfundió a 20 ml/min (gráfica 5), se puede apreciar el efecto de L-NAME, pero la L-arginina no tiene un efecto marcado en este parámetro tan importante. En este caso, el flujo de 20 ml/min estaría aumentando la producción de NO por lo cual el L-NAME puede inhibirla. La L-arginina no es capaz de aumentar más la producción de NO, probablemente debido a que a este flujo la producción de NO es máxima.

Hasta este momento hemos demostrado indirectamente que el flujo induce la liberación de NO por el riñón y esto afecta la respuesta presora de la fenilefrina. En otros trabajos hemos demostrado que se puede medir la liberación del NO directamente en el corazón perfundido utilizando la técnica de oxihemoglobina <sup>(51)</sup>. Utilizando esta misma técnica, la liberación de NO se midió en el riñón perfundido

a diferentes velocidades (gráfica 6). Encontramos que el flujo estimula la liberación de NO en el riñón a manera de dosis-respuesta.

El mecanismo por el cual el flujo puede estimular la liberación de NO no está completamente claro. Se ha descrito que en el corazón pueden participar los canales iónicos activados por estiramiento <sup>(35)</sup>. Estos canales permiten la entrada a la célula de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de manera inespecífica aunque parece haber preferencia por la entrada de calcio. El calcio puede activar a la SNO constitutiva y de esta manera aumentar la producción de NO.

Una manera de probar la participación de estos canales es inhibirlos con el bloqueador más selectivo que se conoce que es el gadolinio. En nuestros experimentos perfundimos cloruro de gadolinio 5 min antes de realizar la curva de flujo, midiendo simultáneamente la liberación de NO.

En la Gráfica 7 mostramos que el gadolinio bloqueó completamente la liberación de NO. Este resultado difiere del efecto obtenido en el corazón en donde no se observa bloqueo completo en la liberación de NO <sup>(35)</sup>. Esto puede deberse a que en el riñón, la enzima encargada de la producción de NO es la SNO constitutiva que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y que sería la enzima afectada por el gadolinio. En el caso del corazón hay un remanente de NO producido por la SNO inducible.

Quisimos corroborar si la inhibición de la producción de NO por el gadolinio pudiera tener repercusiones fisiológicas. Para investigar esto, perfundimos el gadolinio al realizar la curva de flujo midiendo la PP. En la Gráfica 8 podemos ver

que el gadolinio tiene un fuerte efecto presor. Esto concuerda con la inhibición del efecto vasodilatador del NO.

Finalmente, investigamos si los efectos encontrados se ven modificados durante situaciones patológicas como la hipertensión arterial para lo cual utilizamos el riñón no isquémico de ratas con hipertensión renovascular.

Los resultados mostraron que la fenilefrina tiene mayor efecto constrictor (50 %) en los riñones de ratas hipertensas a flujo de 10 ml/min comparado con ratas normales (gráfica 9).

Por otro lado vemos que el efecto del flujo desplazando la curva dosis-respuesta a fenilefrina se ve casi perdido en las ratas hipertensas ( Gráfica 10). Esto hablaría de una disminución en la producción de ON como ha sido sugerido por varios autores <sup>(9)</sup>. El bloqueador de ON, el L-NAME, no produjo ningún efecto en el cambio de flujo. La presión de perfusión no cambió. Esto se debe a que como se demostró anteriormente, provoca constricción en el riñón normal. Los riñones de ratas hipertensas tienen ya vasoconstricción y no se ve efecto de L-NAME (Gráfica 11).

Este efecto se revertió por la adición de L-arginina, sugiriendo que las alteraciones son secundarias a un déficit en el sustrato, induciendo la inhibición crónica de la SNO, debido a las alteraciones morfológicas producidas por un incremento crónico en la presión sanguínea. Estos datos sugieren que las alteraciones funcionales producidas predominan como los factores patogénicos en este modelo de hipertensión <sup>(9)</sup>.

## **CONCLUSIONES**

- 1.- El flujo sanguíneo modula la respuesta a agentes presores adrenérgicos como la fenilefrina.
- 2.- Esta modulación es producida por la inducción de la liberación de NO.
- 3.- El mecanismo de acción del flujo está mediado por la activación de canales iónicos activados por estiramiento.
- 4.- La hipertensión provoca la pérdida del mecanismo de regulación del tono vascular renal ejercido por el flujo sanguíneo.
- 5.- La vasoconstricción observada en la hipertensión es provocada al menos parcialmente por una disminución en la liberación de NO.
- 6.- El flujo sanguíneo tiene un papel regulador del tono vascular renal y tal vez en general. Puede ser un factor determinante en la patología hipertensiva no solamente por la regulación de la producción de NO, sino posiblemente la modulación de la liberación y producción de otros factores tanto constrictores como dilatadores.

## **REFERENCIAS**

- 1.- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980 The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. No27;288(5789):373-6.
- 2.- Moncada, S. 1993. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145: 201-227.
- 3.- Davis P. F., Barbee, K.A., and Barakat, A. I. 1997. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*. 59: 527-49.
- 4.- Moncada, S., 1991. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology *Pharmacological review* 43(2): 109-136.
- 5.- Rubanyi G M. 1993 The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 suppl 4:S1-14.
- 6.- Chien, S. and Li, S. 1998. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells *Hypertension* 31(2) 162-169.
- 7.- Britten MB, Zehner AM, and Schächinger V. 1999. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Int Med Res*. 245:315-17.
- 8.- Noll G, Wenzel RR, Luscher TF. 1996 Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease.
- 9.- Vargas F, Sabio JM, Luna JD. 1994. Contribution of endothelium-derived relaxing factors to acetylcholine-induced vasodilatation in the rat kidney. *Cardiovasc Res*, 28:1373-1377.

- 10.- Behrendt D, Ganz P. 2002 Endothelial function: From vascular biology to clinical applications 90 Suppl 3:L40-L48.
- 11- Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. 1986. Am J Physiol, 19:H1155-H1149.
- 12.- Zhang J, Snyder SH. 1995. Nitric oxide in the nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1995;35:213-33
- 13.- Ghasso A, Carall C, Irace C, and Cortese C. 2001. Association between shear stress and flow-mediated vasodilation in healthy men. Atherosclerosis. 156(1):171-76.
- 14.- Mattei P, Viridis A, and Salvetti A. 1997. Endothelial function in hypertension. J Nefrol 10(4):192-97.
- 15.- Panza, J A. 1997. Endothelial dysfunction in essential hypertension. Clin Cardiol 20(2) 26-33.
- 16.- Lüscher, T. And Barton, M. 1997. Biology of the endothelium. Clin Cardiol 20 (2) 3-10.
- 17.- Ito S, Carretero OA, and Abe K. 1997. Role of nitric oxide in the control of glomerular. Clin Exp Pharmacol Physiol 24(8):578-81.
- 18.- Raij L. and Baylis C. 1995. Glomerular actions of nitric oxide. Kidney Int 48(1):20-32.
- 19.- Bachman S. and Mundel P. 1994 Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. Am J Kidney Dis 24(1):112-29.
- 20.- Ando J, Komatsuda T, Kamiya A. Cytoplasmic 1988 calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells., In Vitro 24:871-877.

- 21.- Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995, 75:519-560.
- 22.- Traub O. and Berk B. 1998 Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cell transduce an atheroprotective force. *Am Heart Association* 18(5):677-85.
- 23.- Kuo L, Davies MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation in isolated coronary arterioles. 1990 *Am J Physiol* 259:H1063H1070.
- 24.- Ballermann, B. J., Dardink, A., and Liu, A. 1998. Shear stress and the endothelium. *Kidney International* 54(67): 100-108.
- 25.- Alí MH. And Schumacker PT. 2002. Endothelial responses to mechanical stress: where in the mechanosensor? *Crit Care Med* 30(5):S198-206.
- 26.- Shy JY. And Chien S. 2002. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 9(9):769-75.
- 27.- Christopoulos, A., and El-Fakahany, E. 1999. The generation of nitric oxide by G protein-coupled receptors. *Life Sciences* 64 (1): 1-15
- 28.- Robbins R., Grisham M. 1997. Nitric oxide. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 29(6):857-860.
- 29.- Hobbs A J. Higgs E. and Moncada, S. 1999. Inhibitions of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev, Pharmacol. Toxicol*, 39: 191-220.
- 30- Alderton, W.K., Cooper, C. E. and Knowles, G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.
- 31.- Lehoux, S. and Tedgui, A. 1998. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension.* 32:338-345.

- 32.- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular Endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. 1988, *Nature*, 333:664-666.
- 33.- Barbee, K.A. 1995. Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers. *Am J Physiol* 268:H1765-H1772. 1995.
- 34.- Barakat, A. J. 1999. Responsiveness of vascular endothelium to shear stress: potential role of ion channels and cellular cytoskeleton. *Int J Mol Med* 4(4):323-32.
- 35.- Suárez J, Torres JC, Sánchez L. 1999. Flow stimulates nitric oxide release in guinea pig heart: Role of stretch-activated ion channels. *Biochem Biophys Res Commun* 261:6-9.
- 36.- Yang, X. and Sachs, F. 1989. Block of stretch-activated ion channel in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science*. 243: 1068-1071.
- 37.- Cadwell, A R and Clemo, F H. 1998. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol*. 275:C619-C621.
- 38.- Hutcheson, R I. And Griffith, M T. 1996. Mechanotransduction through the endothelial cytoskeleton: mediation of flow- but not agonist-induced EDRF release. *Br J Pharmacol* 118:720-26.
- 39.- Hoyer, J. and Kohler, R. 1997. Mechanosensitive cation channels in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 30(1) 112-19.
- 40.- Yamazaki, T and Komuro, I. 1998. Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 82: 430-37.
- 41.- Traverse HJ, Wang LY, Bache JR. 2000. Coronary nitric oxide production in response to exercise and endothelium-dependent agonists. *Circulation* 101:2526-2531.

- 42.- Naruse, K, Sai, X. and Sokabe, M. 1998. Uni-axial cyclic stretch induces c-src activation and translocation in human endothelial cells via S A channel activation. *FEBS Lett.* 441:111-15.
- 43.- Brayden JE, Quale JM. Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. *Bood Vessels* 1992, 28: 147-153.
- 44.- Suárez J, Rubio R. Regulation of glycolytic flux by coronary flow in guinea pig heart. Role of vascular endothelial cell shear stress. *Am J Physiol* 1991, 261:H1994-H2000.
- 45.- Bevan JA, Joyce EH, Wellman GC. Flow-dependent dilation in a resistance artery still occurs after endothelium removal. 1988, *Circ. Res.*, 63:980-985
- 46.- Ishi K, Chang B, Kerwin JF, Huang ZJ, Murad F. N.Nitro-L-arginine. A potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. 1990, *Eur J Pharmacol.* 176:219-226.
- 47.- Tesfamarian B, Cohen RA. Inhibition of adrenergic vasoconstriction by endothelial cell shear stress. 1988, *Circ. Res.* 63: 720-725.
- 48.- Blardawaj R, Moore PK. Endothelium derived relaxing factor and the effects of acetylcholine and histamine on resistance blood vessels. 1988, *Br J Pharmacol,* 95:835-843.
- 49.- Escan ZS, Soydan AS, Turker RZ. Possible involvement of endothelium in the response of various vasoactive agents in rabbit isolated perfused kidney. 1990, *Gen Pharmacol,* 21:205-209.

50.- Fulton D, McGiff JC, Quilley J. Contribution of NO and cytochrome P450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. 1992, Br J Pharmacol, 107:722-725.

51.- Kelm, M and Schrader, J. 1988. Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart. Eur J Pharmacol. 155:317-321.

52.- Döring HJ. Dehnert H.; The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. Döring C. Ed Biomesstechnik-Verlag Mach GmbH, D-7806 March, West Germany. 1988.