



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**EFFECTO DE MOFETIL MICOFENOLATO SOBRE LA NATRIURESIS DE  
PRESION EN UN MODELO DE HIPERTENSION SENSIBLE A SAL**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA**

**DR. RAFAEL GONZALEZ TOLEDO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA**

**TUTOR: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA**



**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

---

**Dr. José Fernando Guadalajara Boo**

Director de Enseñanza

---

**Dra. Magdalena Madero Rovalo**

Jefe del Departamento de Nefrología

---

**Dra. Martha Franco Guevara**

Investigador en Ciencias Médicas "F"  
Tutor de Tesis

## AGRADECIMIENTOS

A Martha, la mujer de mi vida, por su apoyo en los momentos de flaqueza, su motivación en la adversidad, su confianza en los momentos de duda y comprensión en los momentos de soledad.... Amor, tu eres el motor de todos mis proyectos y de todas mis metas...

A mis padres y hermanos: Rafita, Delmita, Marco y Titis... Ustedes, mi familia, son la mano que me apoya, el hombro que consuela y el abrazo que reconforta...

A Checo, Alfred, Ernest, Cesar y Lalo, que mas que compañeros de generación son mis amigos... Si no fuera por ustedes, la residencia hubiera sido desagradable, triste y tediosa...

A mis maestros: Martha Franco, Magdalena Madero, Héctor Pérez-Grovas, Francisco Rodríguez y todos los médicos adjuntos del departamento por enseñarnos lo que no se lee en los libros...

A la Doctora Martha Franco, mi tutora, por regalarme lo mas valioso que una persona puede ofrecer: confianza, tiempo y amistad... Muchas Gracias Doctora...

A nuestros pacientes, por recordarnos día con día lo frustrante que es no consolar y lo gratificante que es ayudar a recuperar la salud...

Al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por ser la mejor sede formadora de Nefrólogos...

## INDICE

RESUMEN	5
ANTECEDENTES	7
Epidemiología	7
Definición	9
Natriuresis de Presión	10
Curvas de Función Renal Anormales	16
Génesis de Hipertensión Sensible a Sal	18
Lesión Intersticial Renal e Hipertensión Sensible a Sal	21
JUSTIFICACIÓN	26
HIPOTESIS	27
OBJETIVO	27
VARIABLES INDEPENDIENTES Y VARIABLES DEPENDIENTES	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Protocolo Experimental	30
Medición de Presión Arterial	31
Experimentos de Natriuresis de Presión	31
Histología e Inmunohistoquímica	33
RESULTADOS	35
Presión Arterial	35
Filtración Glomerular	36
Excreción Urinaria de Sodio	40
Fracción Excretada de Sodio	45
Infiltrado Túbulointersticial	48
DISCUSIÓN	52
BIBLIOGRAFÍA	62

## RESUMEN

La hipertensión arterial es un problema de salud pública, es una de las principales determinantes de morbilidad cardiovascular y de progresión de insuficiencia renal. La prevalencia de hipertensión arterial se ha incrementado durante las últimas décadas, debido a la adopción de la dieta occidental alta en sal. Existe evidencia de que la hipertensión sensible a sal se acompaña de alteraciones estructurales renales como dilatación tubular, fibrosis intersticial en parches, expresión de osteopontina e infiltrado túbulo intersticial de linfocitos y macrófagos, que impiden una excreción urinaria de sodio adecuada. De forma experimental se ha demostrado que la disminución de estas alteraciones estructurales disminuyen con compuestos inmunosupresores como mofetil micofenolato (MMF). El presente estudio pretende determinar si el MMF mejora la presión arterial mediante la normalización de la curva de natriuresis de presión. Se empleó un modelo de hipertensión sensible a sal inducida con la administración de N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) y se dividieron a ratas Wistar en cuatro grupos: 1) Normal con dieta normal (DNL) (n=5); 2) Normal con dieta alta en sal (DAS) (n=5), 3) L-NAME+DAS (n=6) y 4) L-NAME+MMF+DAS (n=6). Se realizaron estudios de natriuresis de presión con niveles de presión arterial media renal de 90, 110, 130 y 150 mmHg, así como estudios de inmunohistoquímica para valorar infiltrado intersticial de linfocitos y macrófagos y su producción de angiotensina II (ANG II). El grupo de ratas tratadas con L-NAME+DAS desarrolló hipertensión en comparación con los grupos control (156±12 vs. 119±6 mmHg de NL+DAS, p<0.001), por el contrario el grupo L-NAME+MMF+DAS tuvo una

presión arterial normal similar a los grupos control. La filtración glomerular se mantuvo constante en los grupos NL+DNL, NL+DAS y L-NAME+MMF+DAS, en cambio aumentó significativamente para cada nivel de presión arterial en el grupo hipertenso (L-NAME+DAS). La excreción urinaria de sodio y la fracción excretada de sodio fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) a 150 mmHg en L-NAME+DAS vs. NL+DAS y L-NAME+MMF+DAS ( $0.58 \pm 0.18$ ,  $1.75 \pm 0.46$ ,  $2.28 \pm 0.32$  para excreción de sodio y  $0.45 \pm 0.15$ ,  $1.32 \pm 0.38$ ,  $1.64 \pm 0.62$  para fracción excretada de sodio, respectivamente). El número de linfocitos y macrófagos, así como la síntesis de ANG II del infiltrado túbulo intersticial disminuyó significativamente ( $p < 0.001$ ) en el grupo L-NAME+MMF+DAS con respecto a L-NAME+DAS. Los resultados comprueban la hipótesis de que MMF normaliza la curva de natriuresis de presión debido a una menor resorción tubular de sodio.

# **EFFECTO DE MOFETIL MICOFENOLATO SOBRE LA NATRIURESIS DE PRESION EN UN MODELO DE HIPERTENSION SENSIBLE A SAL.**

## **ANTECEDENTES.**

### **Epidemiología**

La hipertensión arterial es un problema de salud pública que parece aumentar conforme se incrementa la edad de la población. Es el principal factor de riesgo para la presencia de eventos vasculares cerebrales, enfermedad cardiaca e insuficiencia renal.

En Estados Unidos en el año 2000, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES, por sus siglas en inglés) reportó una prevalencia del 29%, es decir que cerca de 58.5 millones de individuos tienen cifras tensionales superiores a 140 mmHg (presión sistólica) y/o 90 mmHg (presión diastólica) (1).

Las cifras en México son más alarmantes puesto que la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó que en el 2006 la prevalencia de Hipertensión Arterial Sistémica era de 43.1% (5). El estado más afectado era Sonora, con 58.4% de prevalencia, mientras que el menos hipertenso era Morelos con 34.4%. Como puede observarse, incluso el estado con menos sujetos afectados tiene una media superior a la reportada en las estadísticas internacionales. Otro aspecto que es importante mencionar es que del total de los pacientes hipertensos, sólo el 40% se conoce con el diagnóstico, el 30% de éstos recibe tratamiento y únicamente el 15% del total de individuos tratados está bien controlado (5).



Como lo ilustra la Figura 1, durante las últimas décadas se ha observado un aumento en la prevalencia de hipertensión (16). Hay evidencia de que ese incremento se asocia con la introducción y adopción del estilo de vida y dieta occidentales (rica en grasas saturadas, carbohidratos refinados y alto contenido de sal).

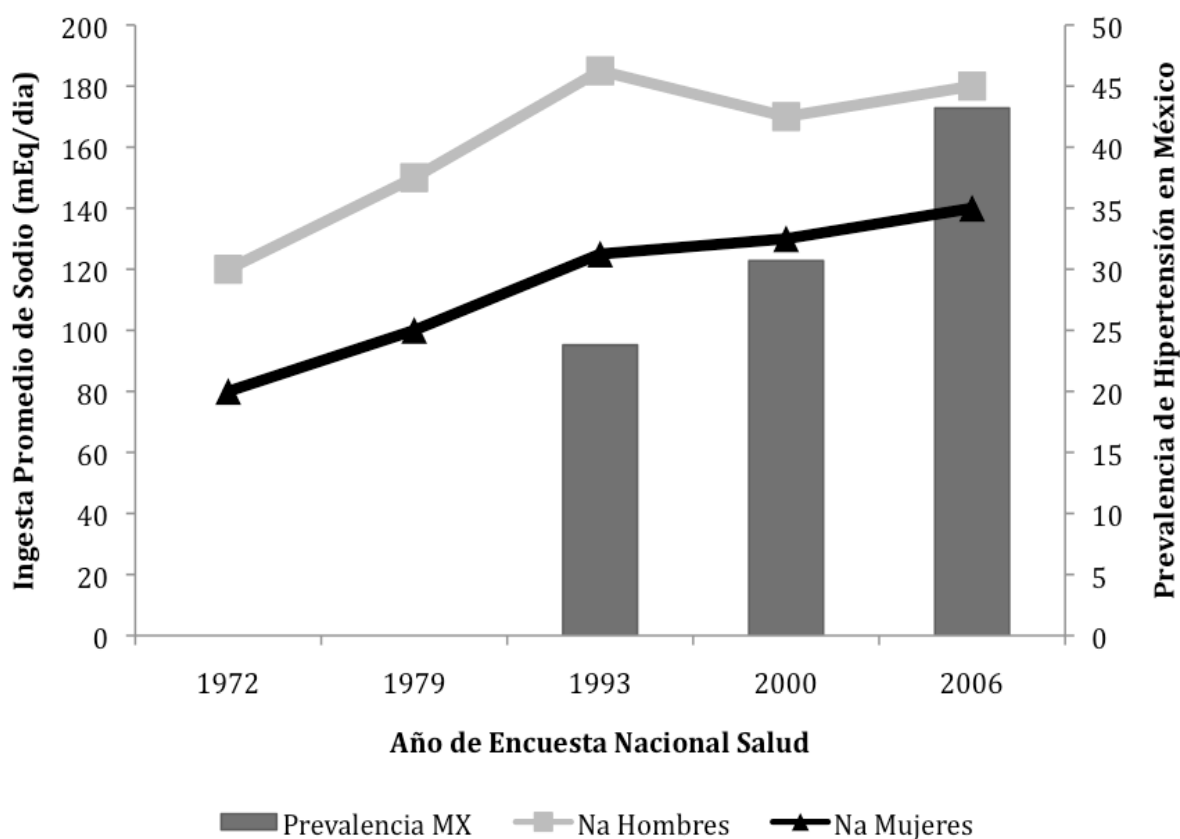


Figura 1. Relación entre la prevalencia de hipertensión arterial con la ingesta de sal

Hasta años recientes había discusión en cuanto al efecto que tiene la carga de sodio sobre el control de la presión arterial debido a que no todos los sujetos muestran la misma respuesta al ser sometidos a dieta alta en cloruro de sodio.

El grupo de Weinberg y colaboradores (18) fueron de los primeros investigadores en establecer que la respuesta al sodio es diferente en sujetos jóvenes y adultos/adultos-mayores. Mediante la exposición de los pacientes a una sobrecarga de sodio y posteriormente a una depleción del mismo, establecieron que los individuos mayores de 60 años tenían una mayor sensibilidad de la presión arterial al sodio que los pacientes más jóvenes: La presión arterial se modificaba más de 10 mmHg al comparar las cifras obtenidas tras la administración de solución salina con aquéllas encontradas después de la depleción de sal (18). Además de los resultados anteriores, Midgley y colaboradores, en un meta-análisis (19) demostraron que los estudios clínicos en los que se evaluaba el efecto de la depleción del sodio dietético sobre las cifras de presión arterial observaban resultados diferentes en sujetos jóvenes comparados con aquéllos encontrados en adultos mayores. En promedio, por cada 100 mmol. de depleción en la ingesta diaria de sodio, se encontraba una disminución de 6.3 mmHg en la presión arterial sistólica de los pacientes mayores de 60 años y de 2.4 mmHg en los pacientes más jóvenes; de manera similar, la disminución en la presión arterial diastólica fue de 2.2 mmHg y 0.1 mmHg, respectivamente (19). La hipertensión que se presenta por la ingesta de sal necesariamente requiere de la participación del riñón (20).

### **Definición**

La hipertensión sensible a sal se define como el incremento en la presión arterial media superior a 10 mmHg al ingerir una dieta alta en sodio en un contexto de depleción de sal inducido por diurético y/o dieta hiposódica (2).

El contenido de sodio extracelular determina el volumen de agua corporal total, y por ende, del volumen plasmático (1). Las modificaciones en el control de sodio del organismo son muy importantes porque pueden llevar a alteraciones de la presión arterial, de tal forma que la incapacidad para excretar este catión a través de la orina invariablemente se asocia a hipertensión arterial (2).

Una de las principales funciones del riñón es la regulación del volumen extracelular mediante la excreción de sodio y agua, que se lleva a cabo mediante dos mecanismos: 1) el sistema renina-angiotensina-aldosterona y 2) la modificación en la excreción de sodio urinario secundaria a los cambios en la perfusión renal, mecanismo conocido como natriuresis de presión (a mayor presión en la arteria renal, mayor excreción urinaria de sodio) (3).

### **Natriuresis de Presión**

El término natriuresis de presión se refiere al mecanismo por el cual los riñones controlan la presión arterial mediante la modificación del volumen corporal. En condiciones de balance, cuando la presión arterial aumenta, los riñones incrementan la excreción de sodio y agua, disminuyendo el volumen plasmático y ocasionando que la presión regrese a valores basales.

La importancia de la natriuresis de presión en el control de la presión arterial se puso en evidencia por primera vez mediante estudios realizados por AC Guyton y colaboradores (4): Estos investigadores administraron el 30% del volumen sanguíneo total

a perros y observaron que el incremento del gasto cardiaco y la presión arterial, ocasionaban también aumento del gasto urinario y de la excreción urinaria de sodio, normalizándose las cifras de presión arterial a las dos horas de haber administrado la carga de volumen.

En la Figura 2 se ilustran varios mecanismos que controlan la presión arterial después de una modificación súbita. Como puede observarse, los mecanismos de control nervioso (barorreceptores, quimiorreceptores y sistema nervioso central) son los primeros en actuar para estabilizar la presión arterial. La excreción urinaria de sodio tiene un papel incipiente a los 60 minutos y preponderante y prácticamente único después de las 8-16 horas de haberse llevado dicho el cambio de presión arterial. (21)

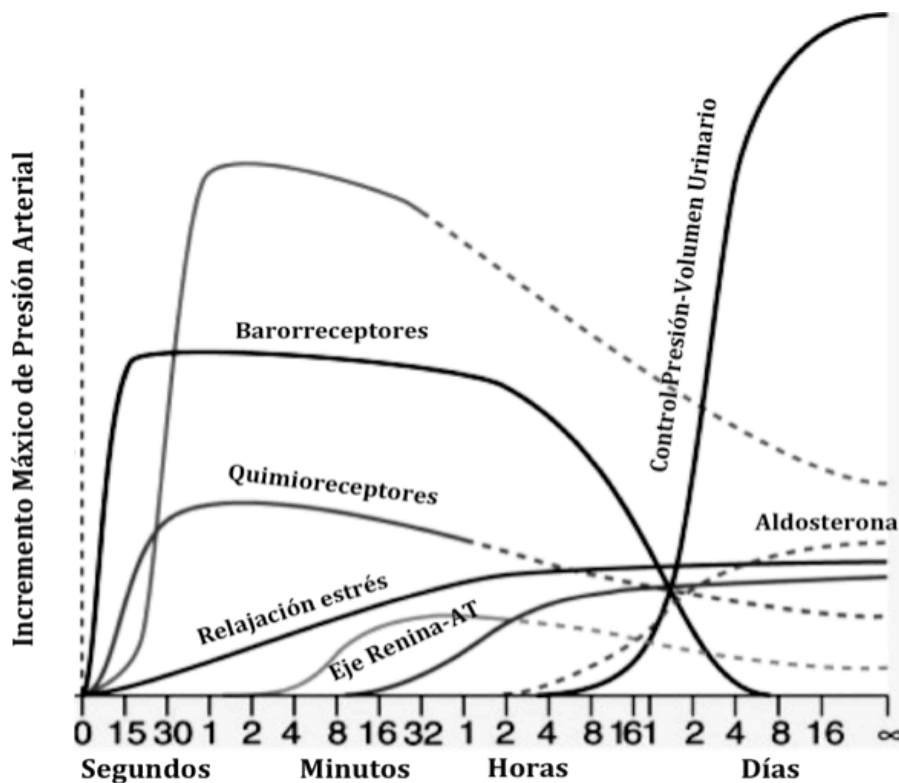


Figura 2. Mecanismos inmediatos, mediatos y a largo plazo que participan en la regulación de la presión arterial.

A partir de los 60 minutos la excreción urinaria de sodio se considera un factor primordial sobre el control de presión arterial (7): El incremento en la presión arterial aumenta también el flujo sanguíneo renal, que a su vez incrementa el flujo del líquido tubular que pasa a través de la mácula densa. En este punto se desencadena un mecanismo de retroalimentación entre mácula densa y arteriola aferente consistente en la vasoconstricción de esta última e incremento de la resistencia vascular, teniendo como efecto final la elevación de la resistencia renal total y disminución del flujo sanguíneo renal.

Además de los mecanismos anteriores, el aumento de flujo tubular a través de la mácula densa disminuye también la secreción de renina y la formación de angiotensina II (menor actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona). Debido a que la angiotensina II también tiene un efecto vasoconstrictor sobre la arteriola eferente, la reducción en la concentración del péptido se acompaña de disminución en la resistencia arteriolar y de menor filtración glomerular (7).

La excreción urinaria de sodio depende de la relación de dos factores: la filtración glomerular y la resorción tubular de sodio. Como se ha mencionado anteriormente, cuando la presión arterial aumenta se llevan a cabo mecanismos que mantienen estable o disminuyen la filtración glomerular, por lo que la mayor eliminación urinaria de sodio depende de una menor resorción tubular (22). Algunos estudios han encontrado que ésta alteración puede estar relacionada con aumento de la presión intersticial renal (22,23), aumento del flujo sanguíneo medular renal (13) e incremento de prostaglandinas y sistema

kalikreina-kininas; (14) sin embargo el estudio de estos mecanismos está fuera del objetivo del presente trabajo.

En la Figura 3 se observa un esquema que describe los mecanismos que participan en la natriuresis de presión.

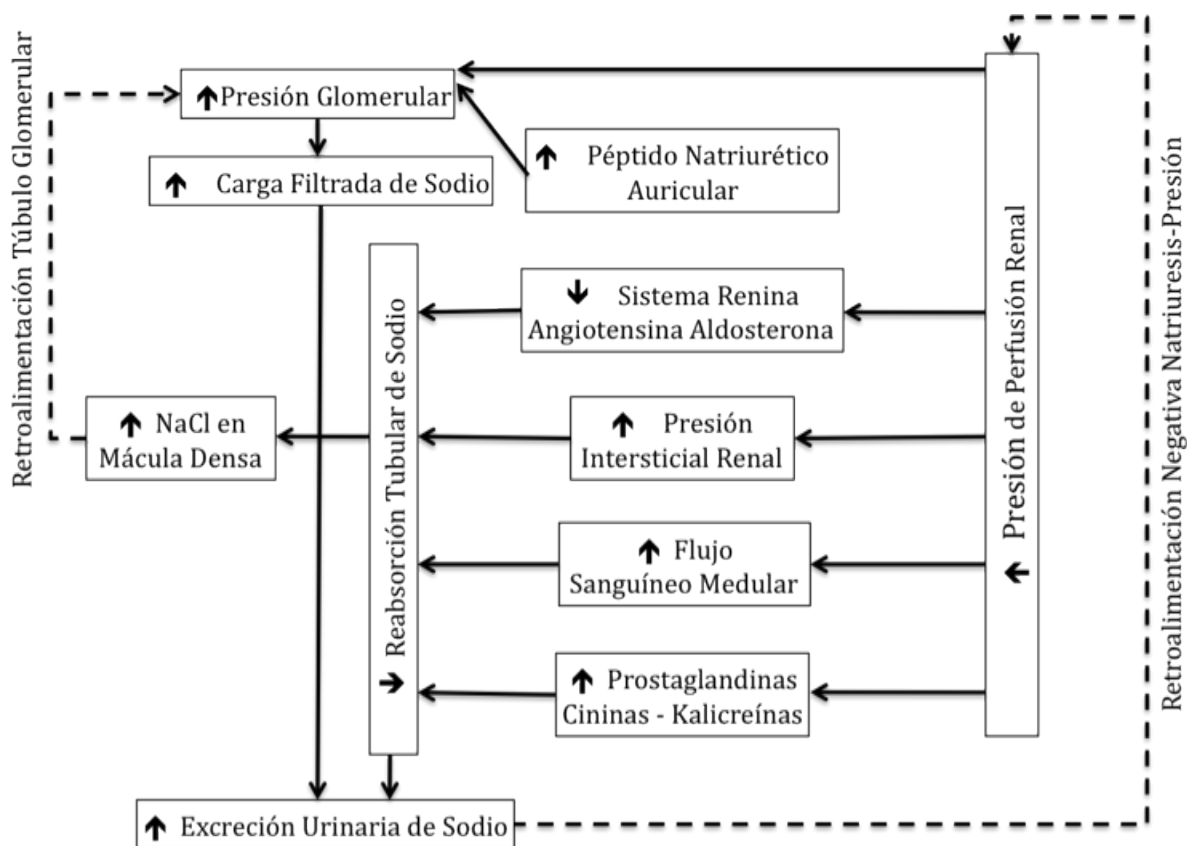


Figura 3. Mecanismos involucrados en el aumento de la excreción urinaria de sodio ante un aumento agudo de la presión de perfusión renal. La presión de perfusión renal tiene un papel central en la regulación de la excreción de sodio urinario mediante la influencia sobre la presión capilar glomerular, sobre el eje-renina-angiotensina-aldosterona, la presión intersticial y el flujo sanguíneo medular, entre otros.

La natriuresis de presión, se representa gráficamente mediante una curva denominada curva de función renal (Figura 4). Esta figura registra en las abscisas la presión arterial, y en las ordenadas la eliminación urinaria de sodio (8).

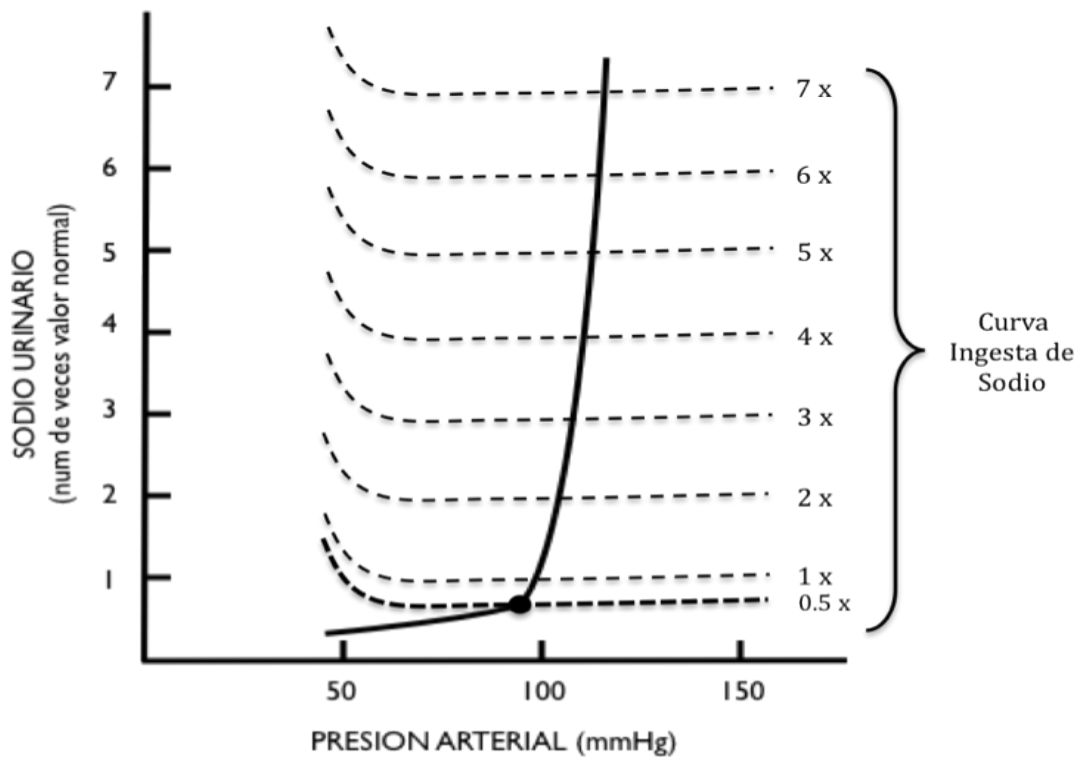


Figura 4. Curva de Función Renal. Esquema de la capacidad del riñón para mantener la presión arterial constante ante cambios en la ingestión de sodio a través de su excreción urinaria.

En esta gráfica se puede observar que conforme aumenta la presión arterial, llega a un punto en el que la excreción urinaria de sodio aumenta exponencialmente, de tal forma que pequeños cambios de presión inducen grandes cambios en la excreción urinaria de

sodio. Del mismo modo puede observarse que en condiciones de balance la ingesta de sodio hasta siete u ocho veces el valor normal, no modifica la presión arterial.

La figura 4 también se establece que la presión arterial está relacionada con la eliminación urinaria de sodio y con la ingesta de sal, de tal forma que si la ingesta es superior a la eliminación de sodio y al gasto urinario, el volumen corporal se incrementa junto con la presión arterial. Este hallazgo sugiere que en condiciones de balance, la presión arterial se encuentra exactamente en el mismo punto en que la eliminación urinaria de sodio y la ingesta de sal se encuentran en equilibrio (8).

El punto en que tanto la excreción urinaria de sodio como la ingesta de sal son exactamente iguales recibe el nombre de *punto de equilibrio*, y se localiza gráficamente en el sitio donde ambas curvas se intersectan (curva de excreción urinaria de sodio y curva de ingesta de sal) (Figura 4). Este punto puede ser utilizado para predecir el valor de presión arterial a largo plazo. Cuando existe un valor de presión arterial superior al punto de equilibrio, tanto la eliminación urinaria de sodio como el volumen urinario aumentan más que la ingesta de sodio; por el contrario, cuando el valor de presión arterial se encuentra por debajo del punto de equilibrio, se produce una mayor ingesta de sodio en comparación con la eliminación urinaria de sodio y el volumen de orina.

La natriuresis de presión permite un control muy exacto de la presión arterial y está regulado por un principio denominado *Principio de Retroalimentación de Ganancia Infinita* (8).



El principio de retroalimentación de ganancia infinita significa que este mecanismo de control del volumen corporal siempre mantendrá la presión arterial en su nivel basal (punto de equilibrio), independientemente de la magnitud y dirección del cambio temporal de las cifras de presión arterial. Este principio de ganancia infinita se sustenta en tres leyes (9):

- I) Es imposible modificar el control crónico de la tensión arterial a un valor distinto sin alterar primeramente el punto de equilibrio.
- II) Si el punto de equilibrio se modifica, lo hará también de manera subsecuente, el nivel de presión arterial a largo plazo.
- III) Las dos principales determinantes del control de la presión arterial a largo plazo son la curva de función renal y la curva de ingesta de sodio, por lo tanto sólo aquéllos factores que modifiquen alguna de estas variables tienen la capacidad de alterar la presión arterial

### **Curvas de Función Renal Anormales**

La curva de función renal que representa a la hipertensión sensible a sal es aquélla en que la pendiente es menor con respecto a la curva normal y existe desviación hacia la derecha (11) (Figura 5).

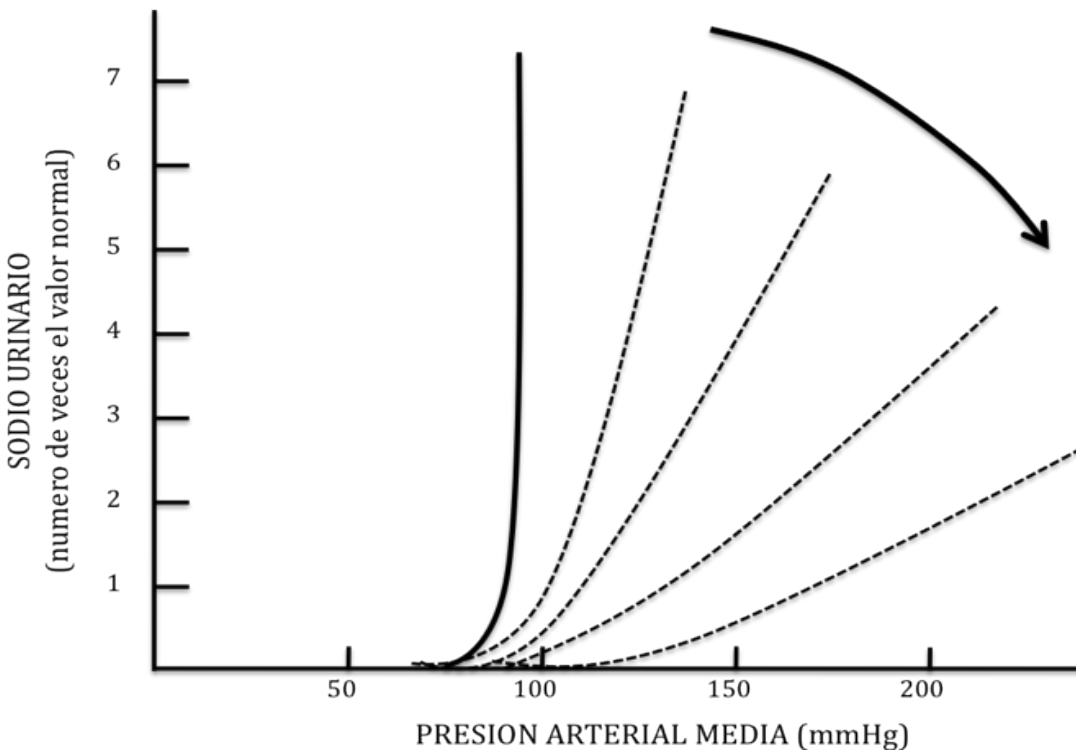


Figura 5. Esquema de la modificación de la curva de natriuresis de presión en condiciones patológicas.

Esta alteración en la curva de función renal traduce una menor capacidad de excreción urinaria de sodio, defecto que se acompaña de cifras elevadas de la presión arterial sistémica. Analizando esta gráfica resulta evidente que conforme se incremente la ingesta de sodio, aumentará también la presión arterial.

Algunos investigadores, entre ellos Kimura y colaboradores y Brenner y colaboradores (24, 25) consideran que este tipo de curva está determinada por el coeficiente de filtración ( $K_f$ ) y la tasa de reabsorción tubular de sodio, por lo que la disminución en el primero o aumento en la segunda, ocasionan hipertensión sensible a sal

(24, 25); sin embargo aunque el Kf y la reabsorción tubular son factores muy importantes, no son los únicos involucrados en la excreción urinaria de sodio ni en las anormalidades de la curva de natriuresis de presión. Se considera que alteraciones en la regulación del sistema renina angiotensina, la hiperactividad del sistema simpático y la disminución de nefronas son los principales factores que modifican la curva de natriuresis de presión (2).

### **Génesis de Hipertensión Sensible a Sal**

Recientemente Johnson y colaboradores publicaron una teoría que explica los mecanismos patogénicos que anteceden a la elevación de cifras de presión arterial secundarios a ingesta abundante de sal (13).

Según su teoría, el desarrollo de hipertensión arterial pasa a través de estadios en los cuales la presión arterial se eleva episódicamente antes de mantenerse persistentemente alta.

Las cifras de presión arterial, oscilan durante el día, llegando a registrar presión sistólica de hasta 150 mmHg (28, 29), incluso en sujetos catalogados como normotensos. Es probable que esta elevación transitoria de presión arterial esté relacionada con hiperactividad del sistema nervioso simpático inducida por factores genéticos, ambientales o familiares (27), y activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona; los individuos que experimentan estos cambios de presión arterial son los llamados sujetos hiperreactores (26). Estas oscilaciones representan la primera fase de la hipertensión sensible a sal.

El mecanismo de autorregulación renal tiene como objetivo aumentar la resistencia de la arteriola aferente para evitar que las elevaciones de presión arterial sistémica sean transmitidas al glomérulo.

Esta autorregulación renal comprende dos factores principales: el mecanismo miogénico, propio de la mayoría de los lechos vasculares, y el mecanismo de retroalimentación túbulo glomerular (30).

La teoría del Johnson y colaboradores se fundamenta en que la autorregulación no es inmediata ni protege completamente; (13) al menos de una manera transitoria la hipertensión puede ser transmitida no tanto al glomérulo sino a los capilares peritubulares post-glomerulares. Estos cambios hemodinámicos se asocian con incremento en la presión capilar peritubular que ha sido corroborado en experimentos en que se infunde norepinefrina y angiotensina II (31). Otros reportes sugieren que estos cambios hemodinámicos son mas importantes en la región yuxtamedular (32). Un aspecto muy importante de mencionar es que estos cambios de presión capilar no se acompañan de incremento de flujo sanguíneo local; por el contrario, hay evidencia de que en modelos de hipertensión experimental por infusión de angiotensina II (33) se encuentra una disminución del flujo sanguíneo, sobre todo del flujo medular y yuxtamedular renal.

La exposición transitoria de los vasos sanguíneos renales a presión arterial elevada, en forma repetida y frecuente, facilita la transición hacia un estado de hipertensión arterial persistente y desarrollo de sensibilidad a sal. Los capilares glomerulares, a diferencia de los post-glomerulares están mejor adaptados a cambios de presión arterial debido a la

existencia de podocitos y células mesangiales, estructuras que brindan soporte a la pared capilar (13). Los capilares peritubulares, al estar desprovistos de células musculares y/o pericitos, son mas susceptibles de experimentar cambios estructurales secundarios a alteraciones hemodinámicas, como son la transformación de fibroblastos a miofibroblastos alrededor de los capilares peritubulares con la finalidad de proteger de los efectos de la elevación de presión arterial (15).

Además de los cambios en los capilares peritubulares descritos previamente, existen otras alteraciones estructurales encontradas en hipertensión sensible a sal por infusión de angiotensina II como son (15): proliferación del músculo liso vascular (principalmente de la arteriola aferente) (34), atrofia y dilatación tubular, fibrosis intersticial en parches, rarefacción capilar, presencia de osteopontina e infiltrado intersticial de linfocitos y macrófago (15).

En estudios previos, Lombardi y colaboradores (35) infundieron dosis presoras de angiotensina II a ratas durante dos semanas, lo que producía una elevación muy importante de la presión arterial y proteinuria. Después de la suspensión del péptido, como era de esperarse, la presión arterial elevada regresaba a valores cercanos a lo normal y la función renal se recuperaba. El análisis estructural corroboró los cambios histológicos comentados en párrafos anteriores.

La segunda fase de estos experimentos consistió en someter a las ratas a dieta baja y alta en sal (cloruro de sodio al 0.1 y 4%, respectivamente) durante seis semanas. A las tres semanas de iniciada la dieta, se observó que los animales con ingesta alta en sal

desarrollaron nuevamente hipertensión arterial, no así los animales alimentados con una dieta baja en sodio. De esta forma se corroboró que las alteraciones estructurales intersticiales son capaces de inducir hipertensión sensible a sal (35).

Como se ha mencionado previamente, la elevación de la presión capilar peritubular secundaria al incremento repetido de la presión arterial, produce cambios estructurales intersticiales, hipoperfusión e isquemia, tanto de la región medular como yuxtamedular, que condicionan defectos en excreción urinaria de sodio, favoreciendo así el desarrollo de hipertensión sensible a sal. (13)

Con estos postulados, Johnson y colaboradores han sido capaces de explicar las diferencias de la respuesta encontrada después de la disminución de sodio en la dieta de sujetos jóvenes, adultos y adultos mayores con hipertensión. En los primeros, el mecanismo de natriuresis de presión se encuentra íntegro y la hipertensión observada se considera como resistente a sal; por el contrario, en los individuos mayores, en quienes la elevación repetida de la presión arterial ha producido el daño estructural de los capilares peritubulares, se observa incapacidad para eliminar eficientemente el sodio a través de la orina (34).

### **Lesión Intersticial Renal e Hipertensión Sensible a Sal**

La lesión estructural que induce hipertensión sensible a sal se produce no solo por angiotensina II sino también con la administración de fenilefrina (36), ciclosporina (37) e inhibidores de óxido nítrico (34).

Tanto la hiperactividad del sistema nervioso simpático como del sistema renina-angiotensina están involucradas en la primeras fases del desarrollo de la hipertensión sensible a sal. En el caso de la hipertensión inducida por fenilefrina, el grado de hipertensión arterial se correlacionó con el grado de lesión intersticial ( $r^2 = 0.744$ ) (36).

El modelo de hipertensión sensible a sal obtenido mediante la administración de un antagonista del óxido nítrico, N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) durante 4 a 6 semanas a ratas, se acompañó de cambios estructurales y funcionales como son: engrosamiento arteriolar, hialinización glomerular, atrofia tubular, fibrosis e infiltrado inflamatorio intersticial (22,23,38).

Como se ha observado en la mayoría de los estudios, el infiltrado túbulo intersticial renal es un hallazgo universal en los modelos animales de hipertensión sensible a sal y un elemento de importancia crítica en la desviación hacia la derecha de la curva de natriuresis de presión (40), por lo que algunos investigadores, como Rodríguez-Iturbe y colaboradores, sugieren que la disminución del infiltrado túbulo intersticial con compuestos que eviten la acumulación de células inflamatorias en el riñón previene el desarrollo de hipertensión sensible a sal (39).

La importancia del infiltrado túbulo intersticial en la patogenia de la hipertensión arterial se puso en evidencia por primera vez en experimentos de Svendsen y colaboradores (41) realizados hace casi tres décadas, quienes observaron que la hipertensión sensible a sal después de la administración de desoxicorticosterona (DOCA) no se presentaba en ratones sin timo y que los injertos de este órgano restauraban la

hipertensión dependiente de sal. Estos resultados fueron corroborados de manera contundente por Guzik (42) y colaboradores al infundir angiotensina II durante tres semanas a ratas cuyas concentraciones de linfocitos B y T fueron modificadas mediante ingeniería genética. Cuando la angiotensina II era administrada a animales carentes de linfocitos B y T, no se presentaba hipertensión arterial. Si la maniobra se repetía en ratas con mayor población de linfocitos B, la respuesta era la misma, es decir normotensión. Por el contrario, cuando el experimento se realizaba en ratas con presencia de linfocitos T se observaba desarrollo de hipertensión arterial (42).

Con la finalidad de establecer el papel del infiltrado intersticial en la génesis de hipertensión sensible a sal, Quiroz y colaboradores (43) y Rodríguez-Iturbe y colaboradores (45), observaron la respuesta tanto de la presión arterial como del infiltrado intersticial encontradas con la administración de mofetil micofenolato [inmunosupresor que regula la síntesis de novo de purinas e inhibe la proliferación linfocitaria, así como la producción de moléculas de adhesión (44)] en un modelo de hipertensión sensible a sal con L-NAME (43) (un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico) y con angiotensina II (45)

La exposición de la rata a la inhibición de la producción de óxido nítrico mediante L-NAME produjo incremento de la presión arterial, incluso en presencia de mofetil micofenolato (MMF). Sin embargo, después de la suspensión de este bloqueador de las sintasas de óxido nítrico (NO) se observó que aquellas ratas tratadas con MMF, cuando eran alimentadas en una segunda fase con dieta alta en sal, no desarrollaban hipertensión arterial (43). Este estudio concluyó que mofetil micofenolato evitó el desarrollo de



hipertensión sensible a sal. Un hallazgo muy importante en esta serie de experimentos fue que la administración de este inmunosupresor no disminuyó la lesión túbulo intersticial característica de la infusión de L-NAME (definida como dilatación tubular, formación de cilindros y/o expresión de osteopontina por parte de los túbulos) pero sí disminuyó significativamente el infiltrado de macrófagos, linfocitos T, linfocitos T activados y linfocitos T que expresan angiotensina II (43).

La importancia del infiltrado intersticial de linfocitos T y macrófagos, así como y su relación con los niveles de presión arterial en un modelo de hipertensión sensible a sal (inducida por angiotensina II) se puso en evidencia por Franco y colaboradores (46) mediante experimentos con técnicas de microdiálisis. Estos autores, después de alimentar a las ratas con dieta alta en sal, observaron que los niveles plasmáticos de angiotensina II (determinados 40 días después de suspender la infusión de ANG II) tenían una correlación negativa ( $P < 0.0001$ ) con la presión arterial. Por el contrario, la concentración intrarrenal de angiotensina II, el infiltrado túbulo intersticial de linfocitos T - macrófagos, y la presión arterial tuvieron una correlación positiva ( $p < 0.0001$ ) (46).

La observación que con la administración de mofetil micofenolato la presión arterial se mantenía cercana a límites normales, por razones éticas, ha sido difícil de evaluar en grandes cohortes de pacientes hipertensos; sin embargo estudios clínicos con un número pequeño de pacientes sugieren que la disminución del infiltrado intersticial renal tiene traducción clínica. Por ejemplo, en un grupo de ocho pacientes hipertensos con diagnóstico de artritis reumatoide o psoriasis, con indicación para iniciar mofetil micofenolato como

parte de su tratamiento, Herrera y colaboradores (56) documentaron menor presión arterial durante los tres meses de duración del tratamiento inmunosupresor, con elevación ulterior de la misma luego de la suspensión de este inmunosupresor.

Por otra parte, la relación que guarda el infiltrado intersticial de linfocitos T con la hipertensión sensible a sal y el efecto que tiene la administración de mofetil micofenolato sobre la proliferación de linfocitos T y sobre el infiltrado intersticial nos hace considerar que este inmunosupresor tiene acción indirecta sobre la natriuresis de presión, razón por la cual planteamos la hipótesis de que mofetil micofenolato, al disminuir la inflamación túbulointersticial, normalizará la curva de función renal (representación gráfica de la natriuresis de presión) en un modelo animal de hipertensión sensible a sal.

## **JUSTIFICACIÓN.**

La hipertensión sensible a sal es consecuencia de un trastorno adquirido que se caracteriza por la incapacidad del riñón para eliminar adecuadamente el sodio urinario cuando se ingieren grandes cantidades de sal en la dieta (40).

La hipertensión arterial, es un problema de salud muy importante (5), así como la progresión del daño renal a estadios terminales por hipertensión; la insuficiencia renal secundaria a presión arterial elevada, contribuye en una alta proporción al grupo de pacientes con insuficiencia renal crónica, que representa otro gran problema de salud pública (64). Es importante profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad para derivar estrategias que eviten o retrasen la progresión del daño renal. Es crucial considerar que a pesar de que existen una gran variedad de antihipertensivos y diversas combinaciones de tratamiento no se ha logrado disminuir en forma satisfactoria la nefropatía por hipertensión.

Un mecanismo fisiopatológico que se ha descrito recientemente y que contribuye en forma importante en la progresión del daño renal por hipertensión es el infiltrado túbulointersticial (13). Al respecto se ha demostrado que el infiltrado intersticial de linfocitos y macrófagos encontrado en los modelos animales de hipertensión sensible a sal es fundamental en la génesis de esta enfermedad; por otra parte, la disminución del infiltrado mediante mofetil-micofenolato y otros compuestos, normaliza las cifras de presión arterial y disminuye la lesión renal (43, 45, 54, 55)

En el presente estudio se pretende determinar si la disminución del infiltrado túbulo intersticial normaliza la excreción urinaria de sodio en presencia de dieta alta en sal.

## **HIPOTESIS.**

La disminución del infiltrado intersticial de linfocitos y macrófagos mediante la administración de mofetil micofenolato en un modelo animal de hipertensión sensible a sal, disminuirá la presión arterial mediante la normalización de la natriuresis de presión.

## **OBJETIVO.**

Evaluar el efecto de mofetil-micofenolato sobre la natriuresis de presión en un modelo animal de hipertensión sensible a sal inducida por la infusión de N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) y compararlo con la natriuresis de presión de los grupos control.

## **VARIABLES INDEPENDIENTES.**

- Administración de mofetil micofenolato. Variable cualitativa nominal
- Presión arterial media renal. Variable cuantitativa, continua, de razón

## **VARIABLES DEPENDIENTES**

- Filtración glomerular. Variable cuantitativa, continua, de razón.
- Excreción urinaria de sodio. Variable cuantitativa, continua, de razón.
- Fracción excretada de sodio. Variable cuantitativa, continua, de razón
- Infiltrado túbulo intersticial de linfocitos T y macrófagos. Variable cuantitativa, continua, de razón

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar. Para la comparación de mas de dos grupos se aplicó ANOVA de una vía, seguida de la vía de Tukey. Se aceptó un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . El software empleado para el análisis estadístico fue con Prisma Versión 3.

## **MATERIAL Y METODOS.**

### **Protocolo Experimental**

Los estudios se realizaron en ratas Wistar macho con peso entre 250 y 320g. Las ratas fueron divididas en cuatro grupos: grupo 1: animales normales con dieta normal (NL+DNL, n=5); grupo 2: ratas normales con dieta alta en sal (NL+DAS, n=5); grupo 3: animales con hipertensión arterial y dieta alta en sal (L-NAME+DAS, n=6) y grupo 4: ratas que recibieron mofetil micofenolato (L-NAME+DAS, n=6). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales. Los cuidados se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos del Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología.

El grupo de ratas normales con dieta normal (NL+DNL) no recibió alguna medida dietética o farmacológica especial. Fue alimentado con dieta al 0.4% de NaCl durante nueve semanas y se consideró el grupo control.

El grupo de ratas normales con dieta alta en sal (NL+DAS) fue muy similar al anterior, con la excepción de que después de la quinta semana se alimentaron con dieta alta en sodio al 4% de NaCl y se consideró como control con dieta alta en sal.

El grupo de hipertensión arterial sensible a sal (L-NAME+DAS) fue preparado en tres fases: inhibición de la síntesis de óxido nítrico mediante la administración de N<sup>G</sup>Nitro Metilester de Arginina (L-NAME, Sigma, St. Louis, MO) en el agua de beber (70mg/100 ml) durante tres semanas, basados en estudios previos de Rodríguez-Iturbe y colaboradores (43). El día 21 (ver tabla de seguimientos) se suspendió la administración de L-NAME, se permitió la recuperación de los animales durante una semana con dieta normal en sal

(0.4% NaCl) y posteriormente se les administró dieta alta en sodio (Harlan Co, 4% NaCl) durante 4 semanas.

El grupo de ratas hipertensas que recibieron mofetil micofenolato (L-NAME+MMF+DAS) se indujo de manera similar que el grupo con hipertensión, solo que durante la fase de administración de L-NAME en el agua de beber, también recibió 20mg/kg de mofetil micofenolato (MMF, Roche Pharmaceutical) suspendidos en 500 µl de agua, a través de sonda gástrica. El día 21 se suspendió la administración de L-NAME, se inició dieta normal en sal (0.4% NaCl) y posteriormente se administró durante 4 semanas dieta alta en sal (4% NaCl).

Al final del seguimiento se efectuaron experimentos para evaluar la natriuresis de presión en todos los grupos. Los riñones fueron extraídos para efectuar estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

### **Medición de Presión Arterial**

La presión arterial sistólica (PAS) se determinó mediante pletismografía con un manquito colocado en la cola del animal (Narco Biosystems, Austin, TX). Las ratas fueron condicionadas antes del procedimiento y se dejaban pasar entre 10 y 15 minutos antes de la determinación de la presión. La presión arterial se midió cada dos semanas durante el periodo de seguimiento del estudio.

### **Experimentos de Natriuresis de Presión**

Para los estudios de natriuresis de presión, la rata fue anestesiada con pentobarbital sódico, (30 mg/kg, intraperitoneal), administrando dosis suplementarias a requerimiento.



Se colocó en una mesa termorregulable y se mantuvo la temperatura a 37°C. Con tubo de polietileno se cateterizaron la tráquea (PE-240), ambas venas yugulares, ambas arterias femorales (PE-50) y el uréter izquierdo (PE-10). Se expuso el riñón izquierdo mediante incisión de lumbotomía, se colocó en una cápsula de lucita y se cubrió con algodón humedecido en solución salina fisiológica. Se localizo la aorta y se colocó un clamp ajustable sobre el vaso, entre ambas arterias renales, el cual se fijo mediante un micromanipulador. La presión arterial media (PAM) se monitorizó en forma continua con un transductor de presión (Model p23 LX, Gould. Hato Rey, Puerto Rico, USA) y se graficó en un polígrafo (Grass Instruments, Quincy, MA).

Las ratas se mantuvieron euvolélicas con infusión de plasma isotónico a 10 ml/kg de peso, seguido de infusión de inulina al 1% (Inulina Sigma Aldrich) en solución salina al 0.9% a la velocidad de 30  $\mu$ l/min. Después de 60 minutos de equilibrio, se modificó la presión de la arteria renal (determinada a través del catéter femoral) y se recolectaron muestras de orina durante niveles de presión arterial de 150, 130, 110 y 90 mmHg en todas las ratas. En aquellas ratas en que no se alcanzaron los niveles de presión arterial media deseados, ésta se incrementó mediante la ligadura de las arterias carótidas.

La presión ejercida por el clamp sobre la aorta se modificó con la finalidad de mantener la presión arterial media renal en los valores deseados. Se tomaron muestras de sangre aproximadamente a la mitad de la recolección de orina para calcular las concentraciones de sodio e inulina. Se repuso el volumen con la sangre de una rata donadora. Se monitorizó intermitentemente el hematócrito de la rata durante todo el

experimento. La orina se recolecto por periodos suficientes para alcanzar un volumen de 400-500  $\mu$ l.

El filtrado glomerular total (FGT) se calculó mediante la depuración de inulina (62) con la siguiente fórmula:

$$FGT = \frac{(InulinaU)(VolU)}{InulinaP} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

En que *InulinaU* significa concentración urinaria de inulina, *VolU*: volumen urinario recolectado; *InulinaP*: concentración plasmática de inulina.

La concentración urinaria de sodio se calculó mediante la siguiente fórmula

$$UNaV = (NaU)(V) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En que *NaU* es la concentración urinaria de sodio y *V* es el volumen urinario recolectado

La fracción excretada de sodio (FENa) (63) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$FENa = \frac{(NaU)(CrS)}{(NaP)(CrU)} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

En que *NaU* significa concentracion urinaria de sodio; *NaS*: concentración sérica de sodio; *CrU*: concentración urinaria de creatinina; *CrS*: concentración sérica de creatinina.

La determinación de sodio se realizó mediante flamometría (Flanoetro IL, modelo 943) y se expresó en mEq/L.

## **Histología e Inmunohistoquímica**

Al terminar el experimento de natriuresis de presión, se extrajeron ambos riñones, se cortaron en forma coronal, se fijaron en paraformaldehído al 4% con pH 7.4 y se

incluyeron en parafina. Los cortes se tiñeron mediante las técnicas de ácido periódico de Schiff (PAS) y hematoxilina-eosina (HE). Todas las evaluaciones fueron realizadas desconociendo el grupo al que pertenecía el riñón evaluado.

Para la detección de linfocitos (células CD5 positivas) y macrófagos (células CD68 positivas) se utilizaron anticuerpos marcados con avidina-biotina-peroxidasa. La infiltración celular fue evaluada por separado en glomérulos y región túbulo-intersticial según el número de células positivas por cada corte glomerular o células positivas por cada milímetro cuadrado, respectivamente.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti CD5 (anticuerpo monoclonal de ratón contra linfocitos y timocitos) y anti CD68 (anticuerpo monoclonal contra monocitos y macrófagos) (Biosource International Camarillo, CA).

La doble inmuno-tinción fue realizada para definir el porcentaje de células CD5+ y CD68+ que teñían positivamente para angiotensina II (células AII positivas). La técnica ha sido descrita previamente (59) y consiste en: *i*) incubación con anticuerpos monoclonales CD5 y CD68; *ii*) incubación con fragmentos de anticuerpo [F(ab')<sub>2</sub> purificado con afinidad a conjugados de rodamina] con mínima reacción cruzada a proteínas; *iii*) incubación con anticuerpos anti-angiotensina II; y *iv*) incubación con anticuerpos conjugados con fluoresceína (aminofluoresceína diclorotriazinil) contra IgG de ratón con mínima reacción cruzada a proteínas.

## RESULTADOS.

### Presión Arterial:

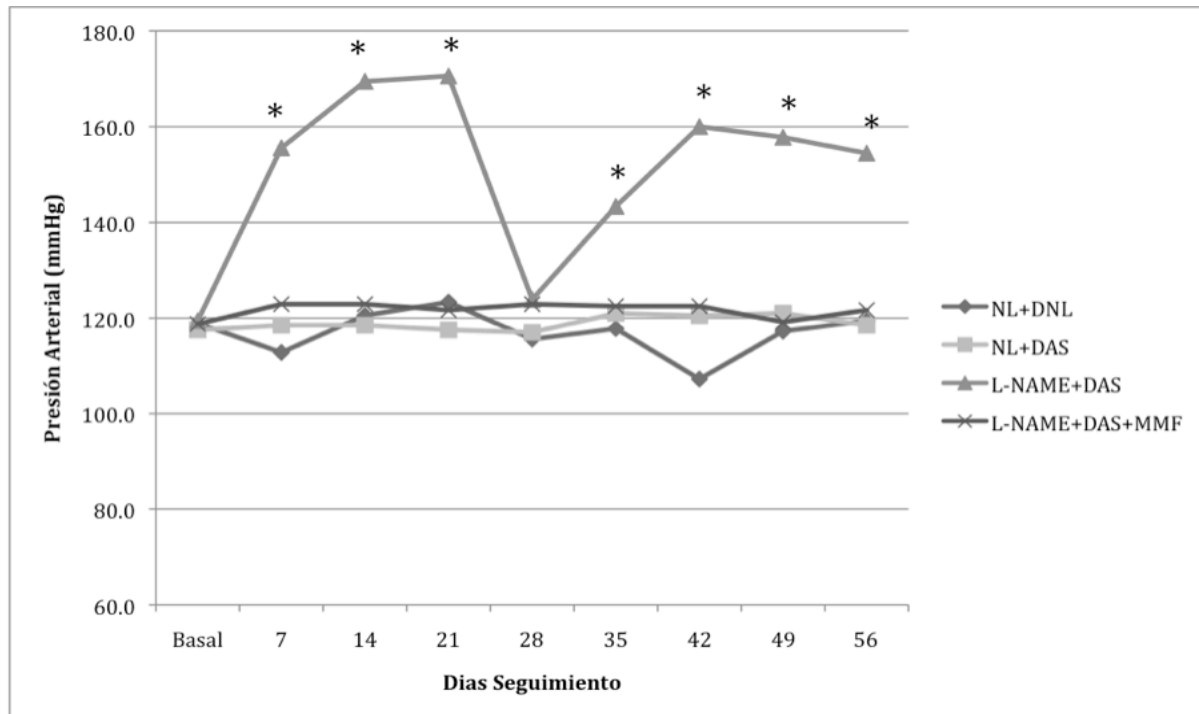
El efecto de L-NAME sobre la presión arterial sistólica se observó a partir de la primer semana (día 7) de administración, en que se elevó a  $156 \pm 12$  mmHg y se mantuvo en valores similares ( $154 \pm 13$  mmHg) durante todo el periodo de seguimiento (Tabla 1).

**Tabla 1. Seguimientos de Presión Arterial (mmHg) Durante la Evolución**

TAS	Basal	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
NL+DNL	119±10	113±14	121±10	123±4	116±7	118±8	107±9	117±8	119±5
NL+DAS	118±6	119±6	119±7	118±5	117±7	121±8	121±9	121±5	119±2
L-NAME+DAS	119±6	156±12*	169±11*	171±10*	124±9	143±17*	160±13*	158±11*	154±13*
L-NAME+DAS+MMF	119±7	123±7	123±7	122±6	123±4	123±6	123±6	119±6	122±6

L-NAME: inhibidor de sintasa de óxido nítrico, DNL: dieta normal, DAS: dieta alta en sal, MMF: mofetil micofenolato. \*  $P < 0.001$  vs. L-NAME+MMF+DAS, NL+DNL y NL+DAS

El grupo L-NAME+DAS+MMF presentó menores cifras de presión arterial durante todo el seguimiento ( $123 \pm 7$  mmHg en día 7 y  $122 \pm 6$  mmHg en día 56), diferencia que fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) al compararse con el grupo L-NAME+DAS (Figura 6). Cuando se suspendió el inhibidor de las sintasas de óxido nítrico en las ratas del grupo L-NAME+DAS se observó una disminución de la presión arterial durante el periodo de siete días en que recibieron dieta normal en sodio (hasta el día 28), posteriormente, cuando recibieron la dieta al 4% de NaCl (del día 28 en adelante), la presión arterial aumentó progresivamente hasta mantenerse entre 150 y 160 mmHg.



**Figura 6. Curva de evolución de presión arterial durante el seguimiento.** La presión arterial se elevó a los 7 días de iniciar el bloqueo de las sintetasas de óxido nítrico con L-NAME; posterior la suspensión de L-NAME (al día 21), la presión arterial disminuyó en grupo L-NAME+DAS y se elevó nuevamente al recibir dieta alta en sal.

\*  $P < 0.001$  L-NAME vs. el resto de las ratas los días 7 al 12 y 35 al 56.

L-NAME: inhibidor de sintasa de óxido nítrico. NL+DNL: grupo normal con dieta normal, NL+DAS: normal con dieta alta en sal, L-NAME+DAS: L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: L-NAME con dieta alta en sal y administración de MMF

### Filtración Glomerular

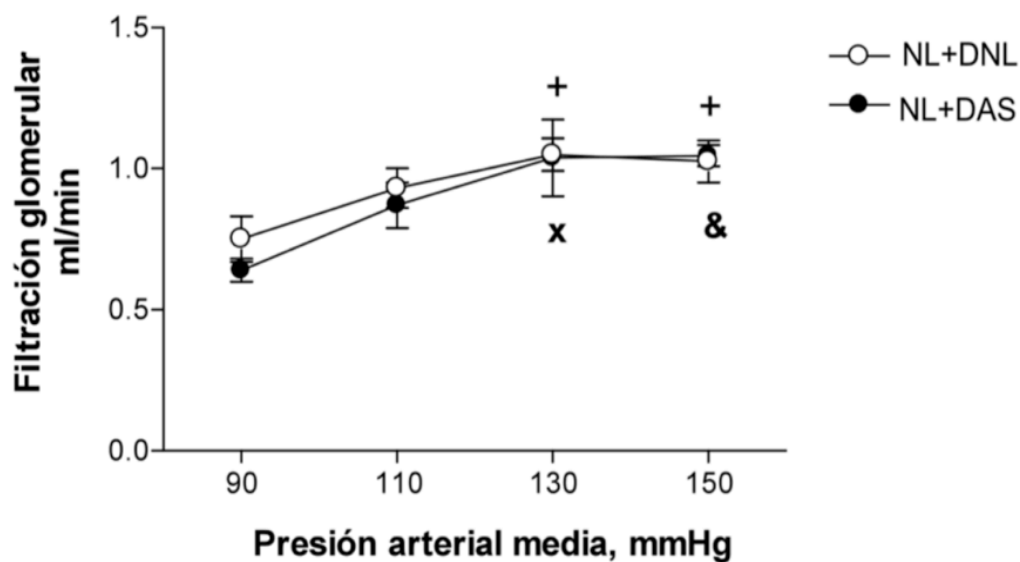
En la Tabla 2 se aprecia que en las ratas normales, tanto las alimentadas con dieta normal como con dieta alta en sal, la filtración glomerular a presión media de arteria renal de 150, 130, 110 y 90 mmHg fue de  $1.02 \pm 0.07$ ,  $1.05 \pm 0.05$ ,  $0.93 \pm 0.07$  y  $0.75 \pm 0.08$  ml/min.,

respectivamente para las ratas normales y de  $1.04 \pm 0.03$ ,  $1.03 \pm 0.13$ ,  $0.87 \pm 0.08$  y  $0.64 \pm 0.04$  ml/min., respectivamente para las ratas normales con dieta alta en sal. El análisis estadístico reportó que la tasa de filtrado glomerular era significativamente diferente con presión arterial media de 90 mmHg ( $p < 0.01$  en grupo normal y  $p < 0.05$  en ratas normales con dieta rica en sodio). La figura 7 representa el filtrado glomerular en las ratas normales con dieta normal y las normales con dieta alta en sal.

**Tabla 2. Filtración Glomerular en los Grupos de Estudio**

TAM	<i>Filtración Glomerular (ml/min.)</i>			
	NL+DNL	NL+DAS	L-NAME+DAS	L-NAME+MMF+DAS
150 mmHg	$1.02 \pm 0.07^x$	$1.04 \pm 0.03^+$	$1.26 \pm 0.09^{\S}$	$1.06 \pm 0.1^{x \uparrow}$
130 mmHg	$1.05 \pm 0.05^x$	$1.03 \pm 0.13^+$	$1.03 \pm 0.1^{\#}$	$1.03 \pm 0.06^{x \uparrow}$
110 mmHg	$0.93 \pm 0.07^x$	$0.87 \pm 0.08^+$	$0.76 \pm 0.13^x$	$0.84 \pm 0.1$
90 mmHg	$0.75 \pm 0.08$	$0.64 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.1$	$0.55 \pm 0.08$

TAM: Presión arterial, NL+DNL: grupo normal con dieta normal, NL+DAS: grupo normal con dieta alta en sal, L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME, con dieta alta en sal y administración de MMF.  $x = p < 0.01$  vs. 90 mmHg.  $+ = p < 0.05$  vs. 90 mmHg.  $\# = p < 0.05$  vs. 110 mmHg.  $\S = p < 0.05$  vs. 130 mmHg.  $\uparrow = p < 0.01$  vs. 110 mmHg.



+=P<0.01 vs. NL+DNL 90  
 x=P<0.05 vs. NL+DAS 90  
 &=P<0.05 vs. NL+DAS 90

Figura 7. Filtración glomerular de grupos control.

NL: normal, DNL: dieta normal, DAS: dieta alta en sal. La filtración glomerular se expresa en ml/min.

La filtración glomerular en las ratas de los dos grupos que recibieron L-NAME a la presión arterial media de 150, 130, 110 y 90 mmHg fueron de  $1.26 \pm 0.09$ ,  $1.03 \pm 0.1$ ,  $0.76 \pm 0.13$ ,  $0.42 \pm 0.1$  ml/min. para el grupo L-NAME+DAS y de  $1.06 \pm 0.1$ ,  $1.03 \pm 0.06$ ,  $0.84 \pm 0.1$  y  $0.55 \pm 0.08$  ml/min. de peso corporal para aquellas tratadas con mofetil micofenolato (L-NAME+DAS+MMF) (Figura 8). En el grupo L-NAME+DAS, la filtración glomerular en los cuatro niveles de presión arterial fueron estadísticamente distintas entre sí, por el contrario, en el grupo que recibió mofetil micofenolato, sólo la filtración glomerular a

presiones bajas (90 y 110 mmHg) fue significativamente menor a 130 y 150 mmHg (Tabla 2, Figura 8). Estos hallazgos sugieren pérdida de la autorregulación glomerular en aquellos animales que recibieron L-NAME.

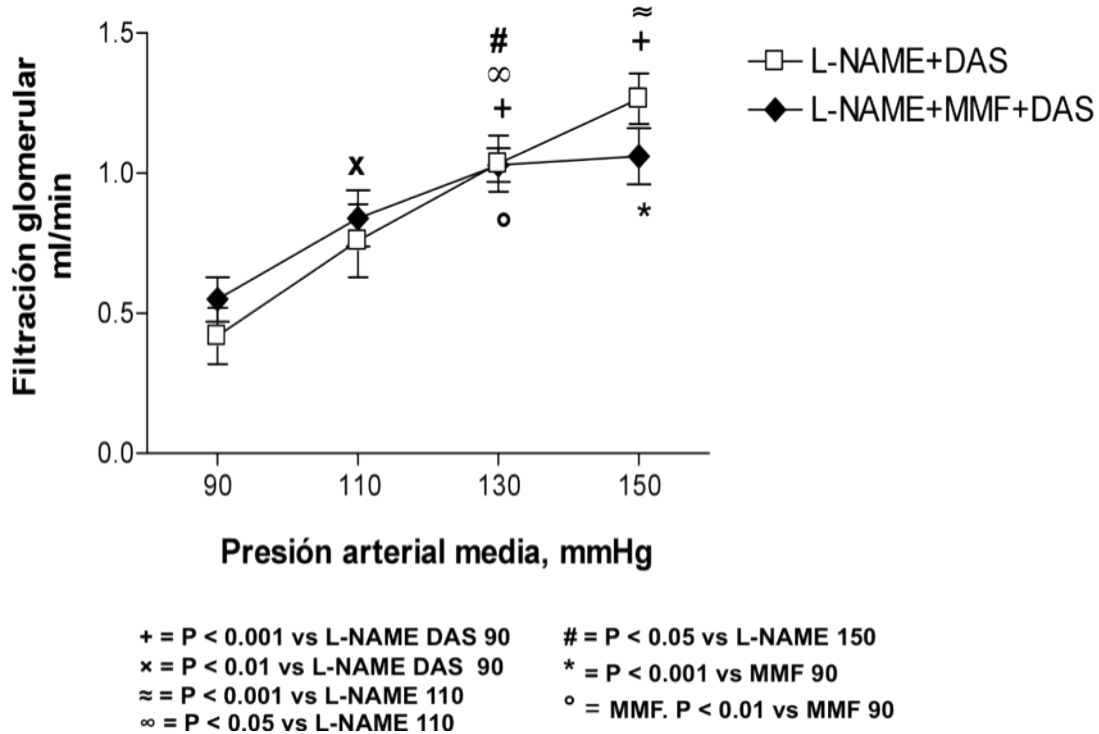


Figura 8. Filtración glomerular en grupos con bloqueo de las sintasas de óxido nítrico.

L-NAME: N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Ester, L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME con dieta alta en sal y administración de MMF

En la Figura 9 se muestran los grupos que recibieron L-NAME y el grupo control con dieta alta en sal (NL-DAS) para su comparación



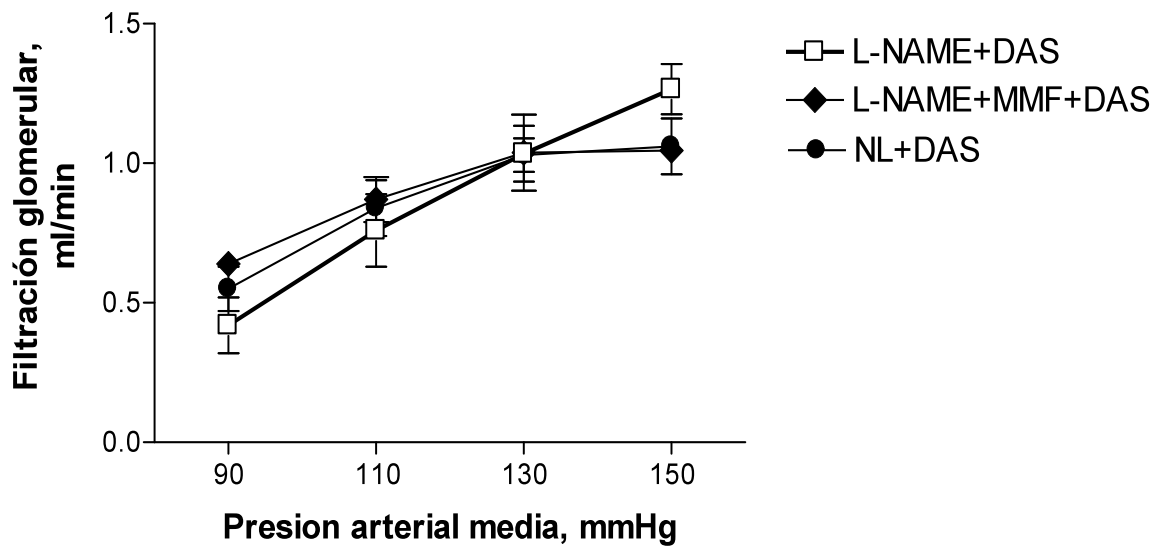


Figura 9. Filtración glomerular de los dos grupos que recibieron L-NAME y el grupo control con dieta alta en sal. L-NAME: N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina Metil Ester, L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME con dieta alta en sal y administración de MMF, NL+DAS: grupo normal con dieta alta en sal, MMF: mofetil micofenolato

### Excreción Urinaria de Sodio:

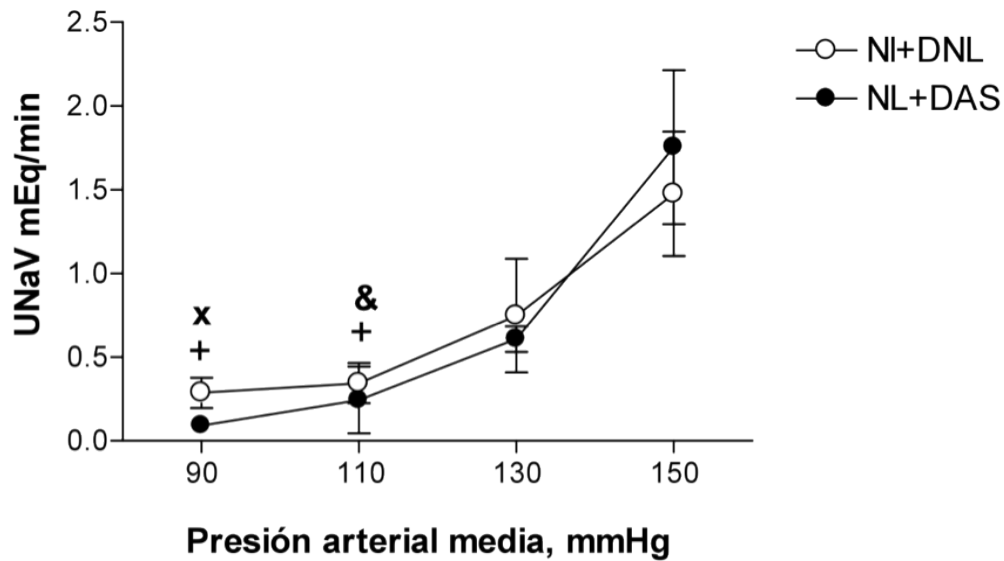
En la Tabla 3 se expresan los valores numéricos de la excreción urinaria de sodio de los grupos estudiados. En los grupos control (ratas normales con dieta normal y con dieta alta en sal) se documentó que la eliminación urinaria de sodio a las presiones medias de 150, 130, 110 y 90 mmHg fueron de  $1.47 \pm 0.37$ ,  $0.74 \pm 0.34$ ,  $0.34 \pm 0.12$ ,  $0.28 \pm 0.09$  mEq./min., respectivamente para las ratas del grupo Normal; en grupo Normal+DAS los resultados fueron de  $1.75 \pm 0.46$ ,  $0.60 \pm 0.076$ ,  $0.24 \pm 0.2$ ,  $0.093 \pm 0.01$  mEq./min., respectivamente. Ambos

grupos de estudio tuvieron eliminación urinaria de sodio estadísticamente mayor a presión arterial media de 150 mmHg ( $p < 0.05$  en comparaciones de 150 vs. 110 mmHg y 150 vs. 90 mmHg). En el resto de las presiones, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 10).

**Tabla 3. Eliminación Urinaria de Sodio en los Grupos de Estudio.**

TAM	<i>Excreción Urinaria de Sodio (mEq/min.)</i>			
	NL+DNL	NL+DAS	L-NAME+DAS	L-NAME+MMF+DAS
150 mmHg	1.47±0.37 <sup>+</sup>	1.75±0.46	0.58±0.18 <sup>NS</sup>	2.28±0.32
130 mmHg	0.74±0.34	0.60±0.076	0.54±0.17 <sup>NS</sup>	1.52±0.24 §
110 mmHg	0.34±0.12 ×	0.24±0.2 •	0.39±0.13 <sup>NS</sup>	0.75±0.26 §
90 mmHg	0.28±0.09	0.093±0.01 °	0.15±0.01 <sup>NS</sup>	0.27±0.07 §

TAM: Presión arterial, NL+DNL: grupo normal con dieta normal, NL+DAS: grupo normal con dieta alta en sal, L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME, con dieta alta en sal y administración de MMF. + =  $p < 0.05$  150 mmHg vs. 90 mmHg, × =  $p < 0.05$  150 mmHg vs. 110 mmHg; ° =  $p < 0.01$  150 mmHg vs. 90 mmHg, • =  $p < 0.05$  150 mmHg vs. 110 mmHg ∞ =  $p > 0.05$ . Todas las comparaciones  $p > 0.05$ . § =  $p < 0.001$ . 150 mmHg vs. 90 mmHg, 150 mmHg vs. 110 mmHg y 130 mmHg vs. 90 mmHg



+= P < 0.05 vs Normal 150  
 x= P < 0.01 vs Normal DAS 150  
 &= P < 0.05 vs Normal DAS 150

Figura 10. Excreción urinaria de sodio de los grupos normales. NL+DNL: grupo normal con dieta normal, NL+DAS: grupo normal con dieta alta en sal. La filtración glomerular se expresa en ml/min.

En el grupo L-NAME+DAS, se documentó que la eliminación urinaria de sodio no se modificó con la elevación de la presión arterial de 150, 130, 110 y 90 mmHg ( $0.58 \pm 0.18$ ,  $0.54 \pm 0.17$ ,  $0.39 \pm 0.13$ ,  $0.15 \pm 0.013$  mEq/min., respectivamente, con  $p > 0.05$  para todas las comparaciones), es decir que el mecanismo de natriuresis de presión era anormal. Por el contrario, en el grupo de ratas L-NAME+MMF+DAS, la eliminación urinaria de sodio en los cuatro niveles de presión arterial media fue de  $2.28 \pm 0.32$ ,  $1.52 \pm 0.24$ ,  $0.75 \pm 0.26$  y  $0.27 \pm 0.07$

mEq/min. (a presiones de 150, 130, 110 y 90 mmHg, respectivamente) (Tabla 3). El análisis mostró que solo había diferencia significativa en la excreción de sodio urinario en las ratas con mayores cifras de presión arterial media (150 y 130 mmHg) con respecto a las de 110 y 90 mmHg ( $p < 0.001$  al comparar de 150 vs. 90 mmHg,  $p < 0.001$  en 150 vs. 110 mmHg, y  $p < 0.01$  en 130 vs. 90 mmHg) (Figura 11). Al evaluar la excreción urinaria de sal entre los grupos que recibieron L-NAME se observó que las ratas que además recibieron MMF (grupo L-NAME+MMF+DAS) tuvieron una mayor concentración de sodio a presiones arteriales medias de 150 y 130 mmHg en comparación con los animales correspondientes al grupo L-NAME+DAS ( $p < 0.01$  en ambas comparaciones). A presión arterial media de 110 mmHg, el valor de  $p$  perdió significancia estadística.

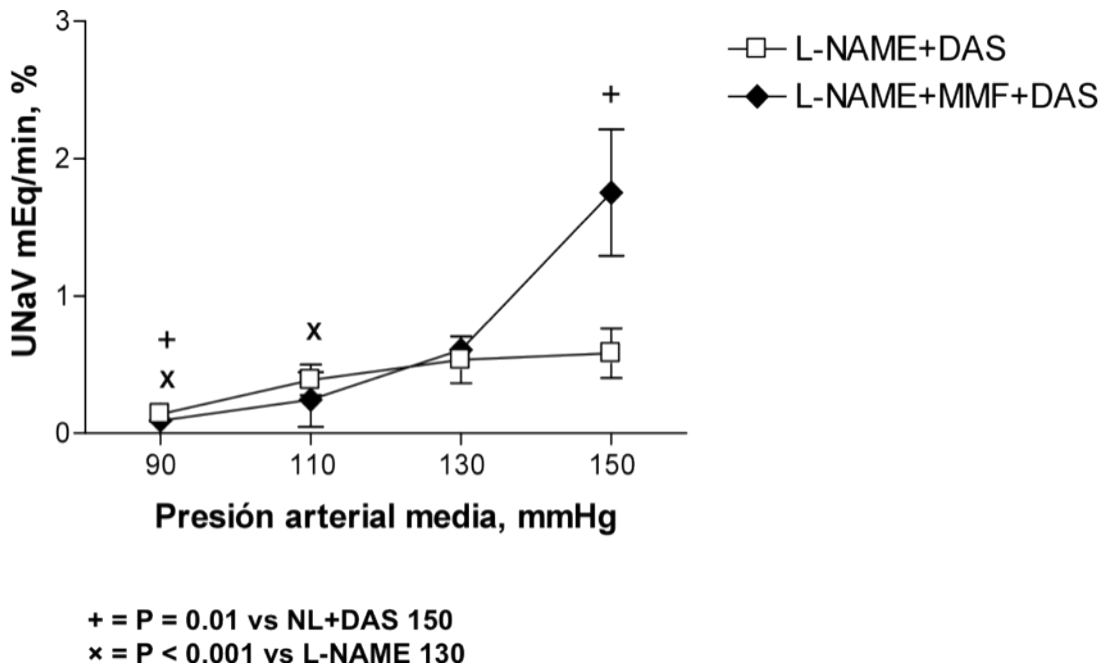


Figura 11. Excreción urinaria de sodio en grupos que recibieron el bloqueador de las sintasas de óxido nítrico. L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME, con dieta alta en sal y administración de MMF.

La figura 12 muestra que las ratas pertenecientes al grupo NL+DAS, al ser comparadas con el grupo L-NAME+DAS, tienen una curva de eliminación urinaria muy similar a presiones medias de arteria renal de 90, 110 y 130 mmHg, sin embargo a 150 mmHg, el grupo NL+DAS incrementa considerablemente el sodio urinario en comparación con el grupo L-NAME+DAS ( $p=0.01$ ).

Es importante mencionar que las curvas de los grupos NL+DAS y L-NAME+MMF+DAS no son completamente similares, difieren a presión arterial media de 130 mmHg ( $p=0.001$ ) y son parecidas en el resto de los niveles de presión arterial media (150, 110 y 90 mmHg) (Figura 12).

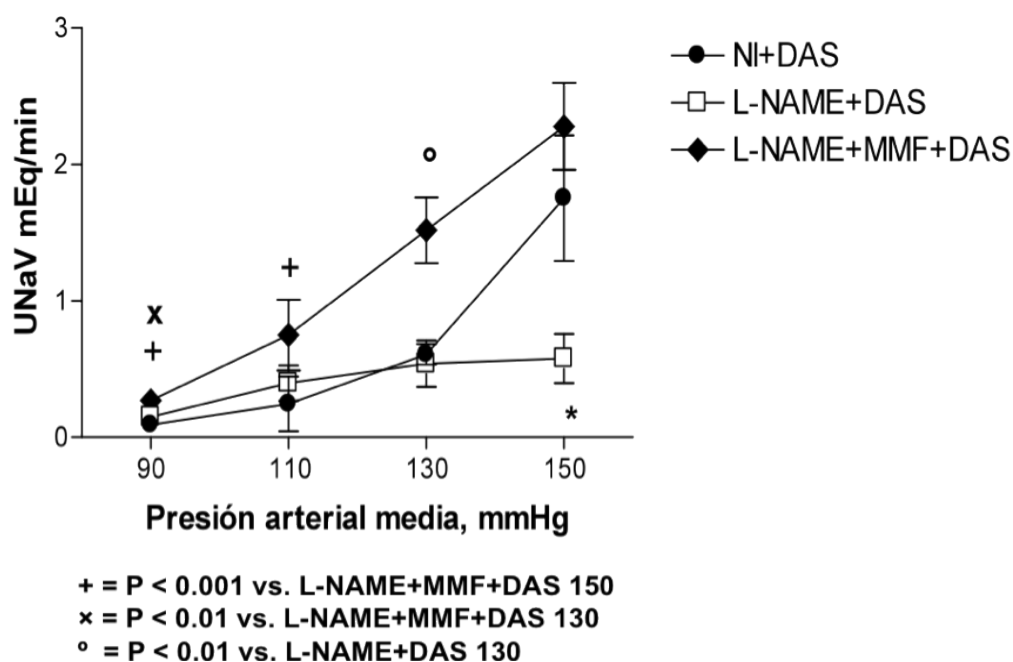


Figura 12. Excreción urinaria de sodio en los dos grupos que recibieron antagonismo de sintasas de óxido nítrico y en ratas con dieta alta en sal. NL+DAS: grupo normal con dieta normal, L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME, con dieta alta en sal y administración de MMF.

## Fracción Excretada de Sodio

La Tabla 4 muestra los valores de la fracción excretada de sodio en los distintos niveles de presión arterial media.

**Tabla 4. Fracción Excretada de Sodio en los Grupos de Estudio**

	<i>Fracción Excretada de Sodio</i>			
TAM	NL+DNL	NL+DAS	L-NAME+DAS	L-NAME+MMF+DAS
150 mmHg	1.30±0.38	1.32±0.38	0.45±0.15	1.64±0.62
130 mmHg	0.74±0.29	0.62±0.09	0.28±0.09	0.96±0.35
110 mmHg	0.49±0.27	0.37±0.3	0.35±0.9	0.52±0.18
90 mmHg	0.27±0.07	0.26±0.1	0.30±0.09	0.35±0.17

TAM: Presión arterial, NL+DNL: grupo normal con dieta normal, NL+DAS: grupo normal con dieta alta en sal, L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME, con dieta alta en sal y administración de MMF. Las comparaciones dentro de cada grupo no fueron significativas

Como se puede observar en la Figura 13, la fracción excretada de sodio es similar entre las ratas normales con dieta normal y las normales+DAS, que responden con un aumento en la fracción excretada de sodio ante el aumento de presión arterial.

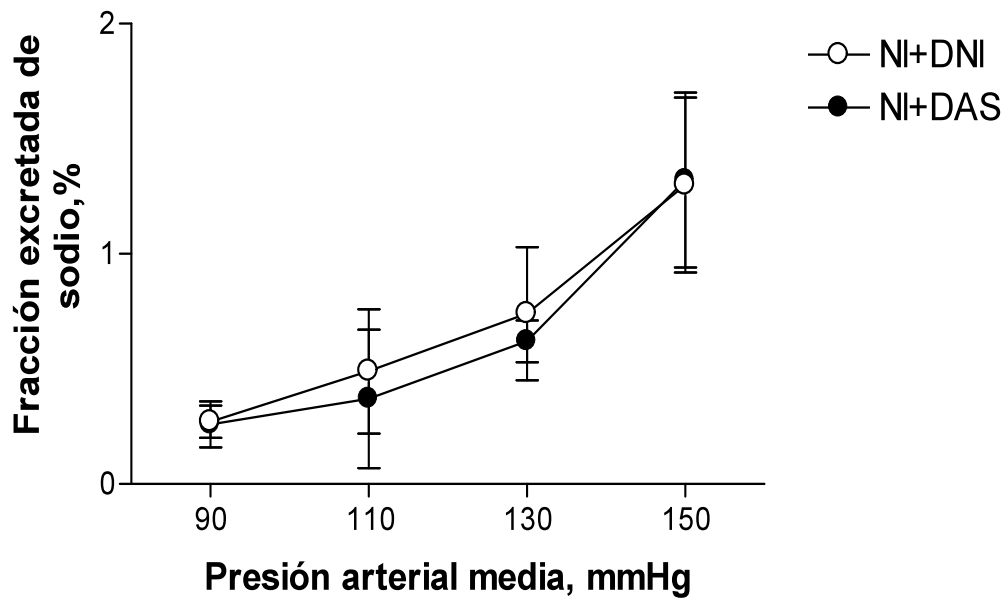
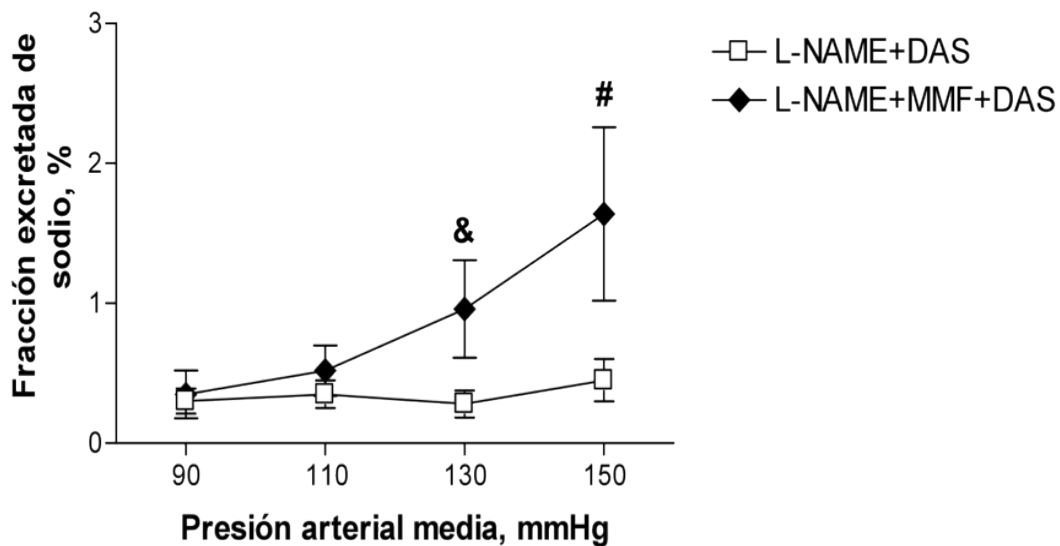


Figura 13. Fracción excretada de sodio en los grupos control.

NL+DNL: grupo normal con dieta normal, NL+DAS: grupo normal con dieta alta en sal

En cambio, como puede observarse en la figura 14, existe una marcada diferencia entre las ratas hipertensas que recibieron L-NAME, y las ratas que recibieron L-NAME+MMF+DAS. La excreción fraccionada de sodio es similar a la normal cuando se evito el infiltrado túbulointerstitial mediante la inmunosupresión.



& = P < 0.001 vs. L-NAME+MMF+DAS 150  
 # = P < 0.01 vs. L-NAME+MMF+DAS 130

Figura 14. Fracción excretada de sodio en los grupos que recibieron antagonismo de sintasa de óxido nítrico  
 L-NAME+DAS: grupo L-NAME y dieta alta en sal, L-NAME+MMF+DAS: grupo L-NAME, con dieta alta en sal y administración de MMF

Cuando se compararon las diferencias de la fracción excretada de sodio entre los grupos de ratas L-NAME+DAS y NL+DAS (Figura 15) se encontró que a 150 y 130 mmHg el valor de  $p < 0.001$ . Esta misma diferencia se apreció en los grupos L-NAME+DAS y L-NAME+MMF+DAS en las presiones arteriales medias de 150 y 130 mmHg ( $p < 0.05$ ). (Figura 14 y 15).



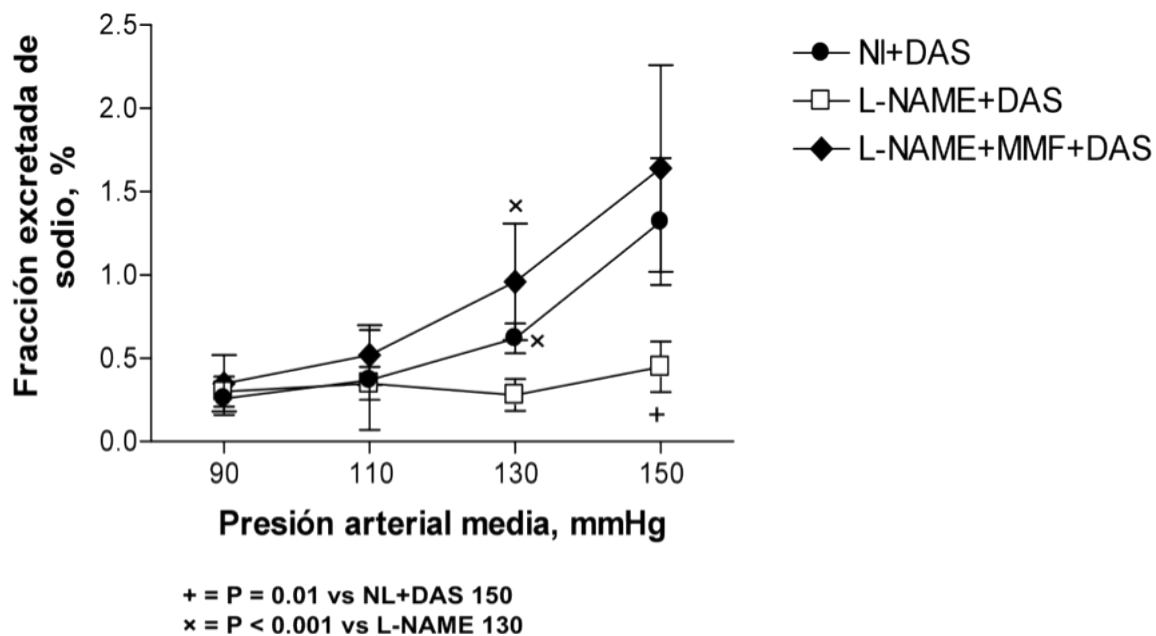


Figura 15. Fracción excretada de sodio en los dos grupos que recibieron antagonismo sintasa óxido nítrico. L-NAME+MMF+DAS: grupo de L-NAME con dieta alta en sal y administración de MMF

### Infiltrado Túbulointersticial

El infiltrado túbulo intersticial que caracteriza a la hipertensión sensible a sal y que tiene un papel primordial en la génesis de esta entidad se encontró disminuido en el grupo de ratas tratadas con mofetil micofenolato (L-NAME+MMF+DAS) comparado con el grupo L-NAME+DAS (Tabla 5). Las células positivas para CD5 traducen la presencia de linfocitos T y las de CD68 de macrófagos. Las diferencias entre los linfocitos, macrófagos y su producción de angiotensina II entre las ratas de L-NAME+DAS y el resto de los grupos fueron significativas ( $p < 0.001$ ). Las Figuras 16 a 19 son fotografías que muestran la producción de ANG II por parte del infiltrado intersticial de los cuatro grupos de estudio.

**Tabla 5. Células del Infiltrado Túbulo-Intersticial (número de células/mm<sup>2</sup>)**

	<b>CD5+</b>	<b>CD68+</b>	<b>ANG II</b>
NL+DNL	9.2 ± 2.17 ×	8.41 ± 1.58 ×	8.81 ± 2.6 ×
NL+DAS	11.92 ± 2.82 ×	9.7 ± 1.4 ×	10.66 ± 2.24 ×
L-NAME+DAS	50.82 ± 10.3	33.55 ± 7.47	31.45 ± 9.06
L-NAME+MMF+DAS	28.21 ± 7.79 ×	22.02 ± 6-05 ×	19.54 ± 4.11 ×

CD5+ traduce linfocitos T, CD68+ macrófagos. El número expresa el promedio de células positivas por mm<sup>2</sup> de tejido intersticial analizado. ANGII (angiotensina II) expresa el promedio de células CD5+ y CD68+ por mm<sup>2</sup> que mediante doble inmunotinción, tiñeron positivas para angiotensina II. Las diferencias CD5, CD68 y ANG II de ratas L-NAME+DAS con el resto de los grupos fueron estadísticamente significativas (× = p<0.001 vs. L-NAME+DAS)

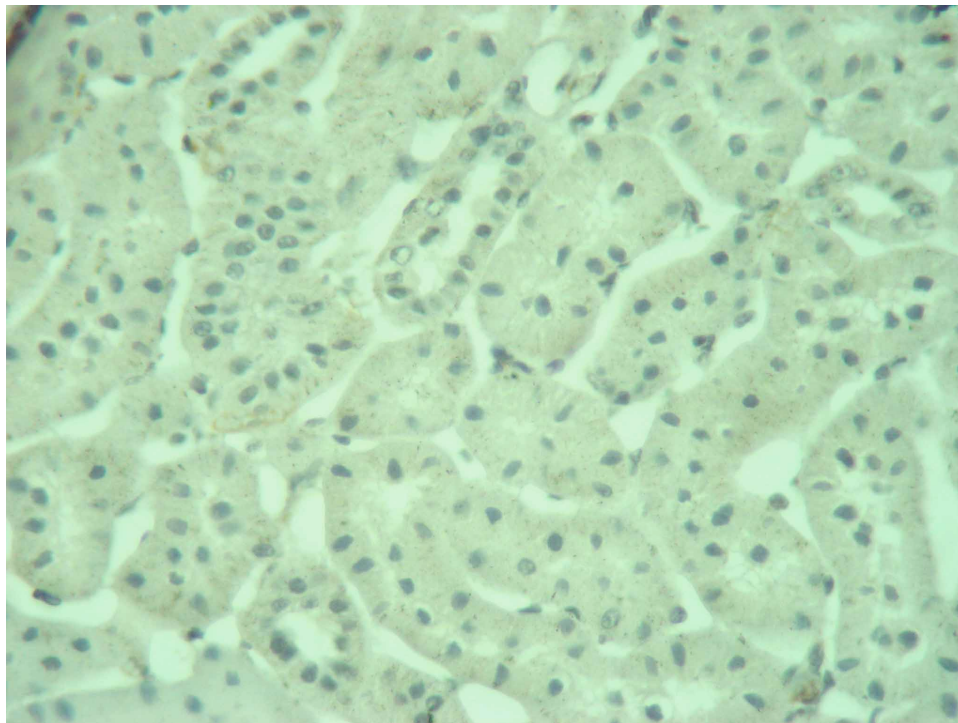


Figura 16. Células CD68+ que expresan ANG II en grupo NL+DNL

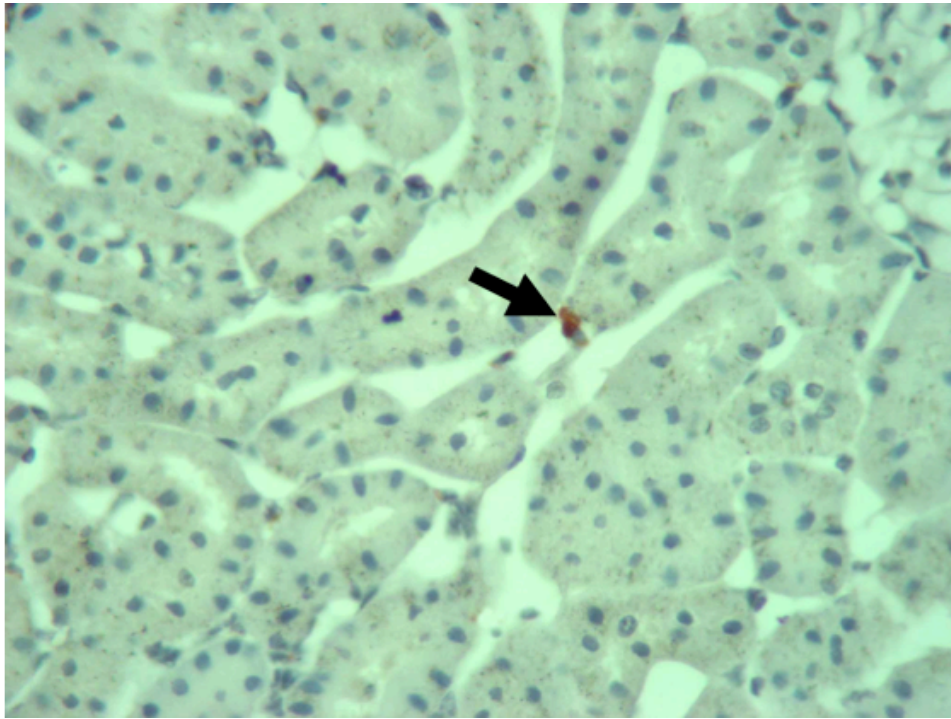


Figura 17. Células CD5+ y/o CD68+ que expresan ANG II en grupo NL+DAS

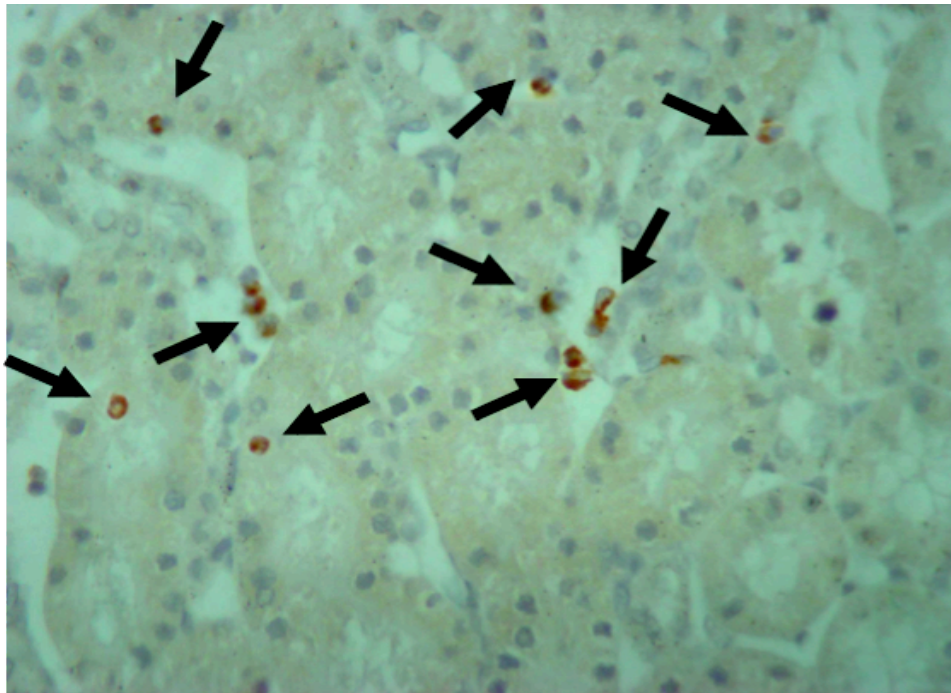


Figura 18. Células CD5+ y/o CD68+ que expresan ANG II en grupo L-NAME+DAS

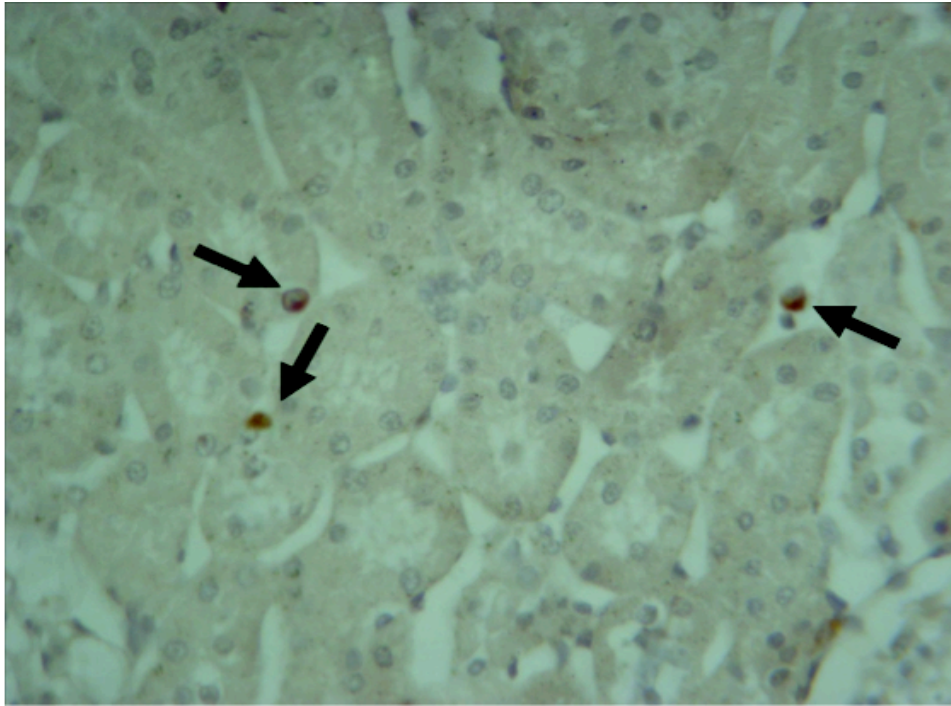


Figura 19. Células CD5+ y/o CD68+ que expresan ANG II en grupo L-NAME+DAS+MMF

## **DISCUSIÓN.**

Las alteraciones del mecanismo de natriuresis de presión tienen una participación central en el balance de sodio que se produce como consecuencia de alteraciones en la microcirculación renal (20,34). En la hipertensión sensible de a sal la curva de la relación presión-natriuresis se aplanan; como consecuencia se requiere de una mayor presión de perfusión renal para mantener la excreción urinaria de sodio dentro de límites normales, por lo que la elevación de la presión arterial es una respuesta adaptativa para mantener el balance de sodio. Actualmente se considera que la inflamación renal asociada a estrés oxidativo y activación del sistema renina angiotensina son un componente central en la alteración de la relación presión-natriuresis (36,39). Esta entidad está íntimamente relacionada con alteraciones en la arteriola aferente y disminución de la red capilar peritubular que puede reducir la capacidad de difusión debido a la acumulación de células inflamatorias y edema, que eventualmente producirán fibrosis en algunas áreas del riñón (36).

El infiltrado intersticial linfocitario es un hallazgo universal que acompaña a los modelos experimentales de hipertensión sensible a sal y otras nefropatías. Esta alteración se ha documentado tanto en animales genéticamente hipertensos (47) como en aquéllos en quienes la hipertensión es inducida experimentalmente (39,43,45).

Algunos investigadores (57) han postulado que el infiltrado túbulo intersticial encontrado en el riñón, junto con la actividad intrarrenal de la angiotensina y el estrés oxidativo, representan una vía común que induce la retención renal de sal.

La presencia de infiltrado túbulointersticial de linfocitos y macrófagos en la hipertensión sensible a sal sugiere un fondo inflamatorio, de ahí que algunos estudios básicos que emplean inmunosupresores como mofetil micofenolato han reportado que la atenuación del infiltrado túbulo intersticial se acompaña de una disminución de la presión arterial.

El mofetil micofenolato es un medicamento que inhibe la síntesis de purinas de los linfocitos al unirse de manera no competitiva y reversible a la enzima inosin-monofosfato-deshidrogenasa. Esta enzima es fundamental para la formación de monofosfato de guanosina (GMP), un importante intermediario en la síntesis de DNA, RNA y glicoproteínas linfocitarias. El efecto final de mofetil micofenolato es inhibir la proliferación de linfocitos y la formación de moléculas de adhesión (65).

En este estudio se inhibió competitivamente la actividad de la sintasa de óxido nítrico mediante la administración de L-NAME para inducir hipertensión sensible a sal. Las diferencias en la presión arterial de los grupos de estudios se hicieron evidentes a partir de la primera semana de inhibición de óxido nítrico y se mantuvieron presentes durante las tres semanas de exposición. Posterior a la suspensión del L-NAME, la presión arterial disminuyó a un valor cercano al basal, sin embargo, al alimentar a las ratas con dieta alta en sal, ésta se elevó nuevamente hasta alcanzar valores de 160 mmHg (Tabla 1); este dato indica que los animales desarrollaron hipertensión sensible a sal. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Rodríguez-Iturbe y colaboradores (20,39 )

Al igual que otros investigadores (43,53,54,55), observamos una disminución de la presión arterial en las ratas tratadas con L-NAME que recibieron mofetil micofenolato (Tabla 1), efecto relacionado con la disminución del infiltrado túbulo-intersticial. Como se menciono previamente el infiltrado de linfocitos y macrófagos en el intersticio está estrechamente relacionado con el desarrollo de hipertensión arterial.

La evaluación de la relación presión arterial - natriuresis incluye la determinación de la filtración glomerular debido a que los cambios en ésta están íntimamente relacionados con la excreción urinaria de sodio.

En el análisis de la filtración glomerular de los grupos estudiados se aprecia que las ratas controles (tanto NL+DNL como NL+DAS) tuvieron los mismos valores a presiones arteriales medias de 150, 130 y 110 mmHg ( $p < 0.05$  en ambos grupos); sin embargo, cuando la presión arterial media renal fue de 90 mmHg se observó una caída en la filtración glomerular. Esta diferencia, al menos en el grupo control con dieta normal (NL+DNL) puede deberse a que 90 mmHg está muy cerca del límite inferior de autorregulación renal y que variaciones transitorias de la presión arterial sean las responsables de la disminución de la filtración glomerular, ya que en algunas ratas fue técnicamente difícil mantener la presión constante y ésta osciló entre 85 y 95 mmHg. Por otra parte, en el grupo normal con dieta alta en sal, el incremento en la ingesta de sodio de manera crónica pudo haber modificado el límite inferior de autorregulación renal. Al respecto se ha sugerido que la dieta rica en sal en forma prolongada puede alterar el mecanismo retroalimentarlo túbulo glomerular,

que es el componente más importante del mecanismo de autorregulación renal, efecto que potencialmente podría disminuir su efectividad, (60, 61) y con ello modificar su lumbral.

Al evaluar la respuesta de la filtración glomerular de las ratas pertenecientes al grupo L-NAME+DAS se observó un incremento continuo ( $P < 0.05$ ) de la filtración glomerular conforme aumentaban las cifras de presión arterial, comportamiento que se explica por la pérdida de autorregulación renal; es bien conocido que la hipertensión arterial de cualquier etiología se caracteriza por un pérdida del mecanismo de autorregulación renal como lo demostraron Wang y colaboradores (58) al estudiar ratas normales, infundidas con angiotensina II e infundidas con angiotensina II más losartán. En este estudio se observó que el flujo plasmático renal en los animales con hipertensión sensible a sal (infusión de angiotensina II) era mayor conforme se incrementaba la presión arterial media, sugiriendo así que la autorregulación renal en este grupo de ratas era anormal (la pendiente del flujo plasmático renal se modificada  $0.4\% \pm 0.02\%$  por cada mmHg que aumentaba la presión por arriba de 100 mmHg en comparación con  $0.14\% \pm 0.03\%$  de los otros dos grupos) (58). Actualmente se considera que la autorregulación deficiente es una de las causas de progresión de daño renal en hipertensión arterial.

Como se puede observar en la Figura 9, el grupo de ratas L-NAME+DAS+MMF tiene una filtración glomerular similar a la del grupo control con dieta alta en sal, hallazgo que sugiere que el tratamiento inmunosupresor mejora la autorregulación renal deficiente que caracteriza a la hipertensión arterial, en este caso hipertensión sensible a sal. Wang y



colaboradores (58), en el estudio mencionado anteriormente, documentaron que el grupo de infusión de angiotensina II más losartán, tenía una filtración glomerular muy similar a las ratas del grupo control. Los resultados obtenidos en este trabajo en el grupo L-NAME+MMF+DAS son similares, pues la filtración glomerular no cambió con la elevación de la presión arterial y se recuperó la capacidad de excretar sodio urinario con los cambios de presión. El hecho de que MMF y losartán tengan efectos similares sobre la natriuresis sugiere una relación entre el infiltrado intersticial y el sistema renina angiotensina que se comentará mas ampliamente en su momento.

En la figura 10, donde se grafica la excreción urinaria de sodio de los grupos control (tanto los que recibieron dieta normal, como dieta alta en sal) se observa una curva normal de natriuresis de presión, es decir que el riñón sano responde con mayor eliminación urinaria cuando se expone a cifras de presión arterial mas alta, sin cambios en la filtración glomerular. Esta diferencia alcanzo significancia estadística cuando se comparó la excreción urinaria obtenida a 150 mmHg con aquélla registrada a 90 y 110 mmHg ( $p < 0.05$ ).

En la Figura 12 puede observarse que las ratas del grupo L-NAME+DAS tuvieron una excreción urinaria de sodio muy baja comparada con el resto de los grupos, dato que traduce incapacidad para eliminar sodio urinario en respuesta al incremento de las cifras tensionales. Se considera que la deficiencia del mecanismo de natriuresis de presión está determinada por la interacción entre actividad de angiotensina II intrarrenal, estrés oxidativo e inflamación intrarrenal (20). Navar y colaboradores han sido de los primeros en

establecer que la angiotensina II tiene varios efectos intrarrenales que potencialmente explican la retención de sal: vasoconstricción directa, aumento de la sensibilidad del sistema retroalimentario túbulo-glomerular, aumento la resorción tubular proximal y distal de sodio, estimulación de la actividad del exportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) y del cotransportador  $\text{NaHCO}_3$  en túbulo proximal, y regulación del canal del sodio sensible a amilorida (66). Por otro lado, el estrés oxidativo disminuye la disponibilidad de óxido nítrico, sustancia que participa en la regulación de la presión intersticial renal, que a su vez controla la resorción tubular de sodio.

Además la generación de peróxido de hidrógeno y superóxido aumentan la actividad de cotransporte  $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}$  y NHE luminal (20). Podemos suponer que en este trabajo, la incapacidad para eliminar adecuadamente el sodio urinario en las ratas del grupo L-NAME+DAS pudiera deberse a alguno o varios de los mecanismos anteriormente descritos, sin embargo el estudiar dichos mecanismos estuvo fuera de la intención de este estudio.

Por otra parte, los animales del grupo L-NAME+MMF+DAS, tuvieron una excreción urinaria de sodio significativamente mayor a la del grupo L-NAME+DAS ( $p < 0.01$  a 130 y 150 mmHg con respecto a 90 y 110 mmHg), hallazgo que sugiere que la administración de este inmunosupresor tiene efecto benéfico sobre la relación presión-natriuresis. Esta respuesta confirma la hipótesis formulada y demuestra claramente que la disminución en la excreción de sodio urinario es responsable de la elevación de la presión arterial en este modelo de hipertensión sensible a sal, y que la disminución de la respuesta inflamatoria

intersticial junto con la menor actividad intrarrenal de angiotensina II son importantes para normalizar la curva de función renal.

En cuanto al mecanismo responsable de la disminución de la excreción de sodio en las ratas con hipertensión, es importante mencionar que la fracción excretada de sodio permite estimar la carga filtrada de sodio, y debido a que existe poca variación de las concentraciones plasmáticas, define el manejo tubular de sodio.

La figura 11 muestra que la fracción excretada de sodio en los dos grupos control (NL+DNL y NL+DAS) se comportaron de manera similar: ambas incrementaban conforme aumentaba la cifra de presión arterial media en ausencia de cambios en la filtración glomerular. Estos resultados son similares a los observados en la excreción urinaria: a mayor presión arterial, menor resorción tubular de sodio y mayor eliminación urinaria.

Cuando se analizaron las curvas de la fracción excretada de sodio en los grupos que recibieron el bloqueador de las sintasas de óxido nítrico, se observó que las ratas hipertensas que no fueron tratadas con inmunosupresor (grupo L-NAME+DAS) tuvieron valores menores que las ratas del grupo L-NAME+DAS+MMF ( $p < 0.05$  a presiones de 130 y 150 mmHg); este dato sugiere que la resorción tubular de sodio se encuentra muy aumentada a pesar de que la filtración glomerular se incrementó en forma significativa en cada uno de los niveles de presión (Figura 9). Como se observa en la Figura 10, la fracción excretada de sodio fue considerablemente mas baja con respecto a los otros tres grupos (NL+DNL, NL+DAS y L-NAME+MMF+DAS). Además, se aprecia claramente como la administración del inmunosupresor normaliza la fracción excretada de sodio, efecto debido

a la disminución del infiltrado túbulointersticial y su menor producción de angiotensina II y citocinas inflamatorias. (68)

A este respecto, Wang y colaboradores demostraron en un modelo de hipertensión sensible a sal inducida por angiotensina II, que la administración de losartán, un antagonista de los receptores de ANG II, normalizaba la presión arterial mediante el aumento de la fracción excretada de sodio (58) y la normalización de la curva de natriuresis de presión. En el presente estudio, el hecho de que mofetil micofenolato haya tenido el mismo efecto que los bloqueadores del sistema renina-angiotensina sobre la presión arterial y la natriuresis, sugiere que la inmunosupresión efectivamente disminuye angiotensina II intrarrenal al evitar la infiltración de monocitos y macrófagos capaces de producir el octapéptido (68)

La angiotensina II se puede sintetizar en varios sitios, entre ellos el riñón (48,49,50,51), incluso existe evidencia de que la concentración del péptido es aproximadamente 1000 veces superior a la encontrada en la circulación sistémica (52) en capilares peritubulares y túbulo proximal.

Navar y colaboradores (66) han propuesto que el incremento de la angiotensina II intrarrenal que acompaña a la hipertensión arterial se debe a dos principales mecanismos: 1) Endocitosis tubular de la angiotensina II sistémica, proceso mediado por receptores tipo 1 de ANG II; y 2) Generación local de angiotensina II a partir de la producción intratubular de angiotensinógeno, efecto demostrado en un modelo de constricción unilateral de arteria

renal en el que el riñón contralateral al riñón con estenosis mostró sobreproducción de novo de angiotensinógeno (67)

Franco y colaboradores (68) demostraron en un modelo de hipertensión sensible a sal, que el infiltrado linfocitario túbulointersticial es capaz de producir angiotensina II (aproximadamente 45 células positivas para ANG II por mm<sup>2</sup> de tejido túbulo intersticial, en comparación con 22 células/mm<sup>2</sup> del grupo control) y que este número de células positivas para ANG II disminuye significativamente tras la administración de mofetil micofenolato (20 células/mm<sup>2</sup>, p<0.05) (68).

Al respecto, la relación entre los niveles de presión arterial y la actividad intrarrenal del sistema renina-angiotensina se puso en evidencia por Franco y colaboradores al demostrar (mediante microdiálisis) que la elevación de la presión arterial se asocia con una elevación tisular renal de angiotensina II y una menor concentración plasmática a pesar de que los animales estaban bajo una dieta alta en sal (46), que en teoría, debería suprimir las concentraciones intrarrenales del péptido.

En cuanto al estudio inmunohistoquímico se encontró que las ratas tratadas con mofetil micofenolato tuvieron menor infiltrado intersticial tanto de linfocitos T (células CD5+) como de macrófagos (células CD68+) en comparación con el grupo de ratas hipertensas que no recibieron MMF (valor p<0.001). También se observó que las células del infiltrado túbulointersticial de las ratas L-NAME+DAS eran capaces de producir angiotensina II; y que el tratamiento inmunosupresor, redujo significativamente el número de células positivas para angiotensina II (Tabla 5, 31.45±9.06 en L-NAME+DAS, 19.54±4.11

en L-NAME+DAS+MMF y  $8.81 \pm 2.6$  en NL+DNL, todas las comparaciones,  $p < 0.001$ ) (Figuras 16 a 19). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de otros autores mencionados previamente (46, 54, 57).

En resumen, podemos comentar que este estudio apoya la hipótesis de que el mofetil micofenolato normaliza las cifras de presión arterial en la hipertensión sensible a sal mediante la disminución del infiltrado túbulointersticial, probablemente al reducir las concentraciones de angiotensina II intrarrenal, lo que permite que la excreción urinaria de sodio retorne a valores cercanos a lo normal.

## **LIMITANTES**

La limitante de este estudio es el número de la muestra estudiada. Consideramos que al utilizar un mayor número de ratas, la diferencia en los resultados tendría menos variación.

## **BIBLIOGRAFIA.**

1. Blumenfeld JD, Laragh JH: Primary and Secondary Hypertension; en Brenner BM (ed): Brenner and Rector's The Kidney. Philadelphia, Elsevier, 2008, Vol. 2, pp. 1465-1528
2. Franco M, Sanchez-Lozada LG, Bautista R, Johnson RJ, et al. Pathophysiology of Salt-Sensitive Hypertension: A New Scope of an Old Problem. *Blood Purif.* 2008;26:45-48
3. Eaton DC, Pooler JP: Control of Sodium and Water Excretion, Regulation of Plasma Volume and Plasma Osmolality, and Renal Control of Systemic Blood Pressure; en Eaton DC, Pooler JP (eds): Vander's Renal Physiology. Atlanta. McGraw-Hill, 2006, pp. 98-133
4. Guyton A, Hall J, Coleman T, et al: The dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. In: Laragh JH, Brenner BM, ed. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, Vol. 2. New York: Raven Press; 1995:1311-1326.
5. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Villalpando S, et al. Hypertension in Mexican Adults: Results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex.* 2010;52(Suppl 1):S63-71
6. Shirley DG, Unwin RJ: Renal Physiology. In: Floege J, Johnson R, Feehally J, ed. *Comprehensive Clinical Nephrology*, Missouri: Elsevier; 2010:15-27.
7. Hall JE, Jackson TE: The Basic Kidney - Blood Volume – Pressure Regulatory System. The Pressure Diuresis And Natriuresis Phenomena. In Guyton AC (ed): *Arterial*

- Pressure And Hypertension, Circulatory Physiology. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1980:87-99
8. Norman RA, Cowley AW, DeClue JW: The Renal Function Curve and its Significance in Long-Term Arterial Pressure Regulation. In Guyton AC (ed): Arterial Pressure And Hypertension, Circulatory Physiology. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1980:100-116
  9. Coleman TG: Infinite Gain Feature of the Kidney – Blood Volume – Pressure Regulator; The Three Laws of Long-Term Arterial Pressure Regulation; Renal Servocontrol of Arterial Pressure. In Guyton AC (ed): Arterial Pressure And Hypertension, Circulatory Physiology. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1980:117-125
  10. Kimura G, Frem GJ, Brenner BM. Renal Mechanisms of Salt Sensitivity in Hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994;3:1-12
  11. Kimura G, Brenner BM: The Renal Basis for Salt Sensitivity in Hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM, ed. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, Vol. 2. New York: Raven Press; 1995:1569-86
  12. McCaa ET, Young DB, Lohmeier TE, Cowley AW, DeClue JW, Pan YJ: The Aldosterone System: It's Role in Determining the Set-Point form Lon-Term Pressure Control by the Kidney-Blood Volume Servo System. In Guyton AC (ed): Arterial Pressure And Hypertension, Circulatory Physiology. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1980:205-224



13. Johnson RJ, Schreiner JF. Hypothesis: The Role of Acquired Tubulointerstitial Disease in the Pathogenesis of Salt-Sensitive Hypertension. *Kidney Int* 1997;52:1169-79
14. Navar LG. Regulation of Renal Hemodynamics. *Adv Physiol Educ.* 1998;20:S221-S235
15. Johnson RJ, Alpers RE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, et al. Renal Injury From Angiotensin II-Mediated Hypertension. *Hypertension* 1992;19:464-74
16. Van Vliet BN, Montani JP. The Time Course of Salt-Induced Hypertension, and Why It Matters. *Int J Obes* 2008;32:S35-47
17. Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B, Bakris GL: Primary Hypertension. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J, ed. *Comprehensive Clinical Nephrology*, 4<sup>th</sup> edition. Missouri: Elsevier; 2010:411-420.
18. Weinberg MH, Fineberg NH. Sodium and Volume Sensitivity of Blood Pressure. Age and Pressure Change Over Time. *Hypertension* 1991; 18:67-71
19. Midgley JP, Matthew AG, Greenwood CMT, Logan AG. Effect of Reduced Dietary Sodium on Blood Pressure: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *JAMA* 1996; 275:1590-1597
20. Rodríguez-Iturbe B, Romero F, Johnson RJ. Pathophysiological Mechanism of Salt Sensitive Hypertension. *Am J Kidney Dis.* 2007;50:655-72
21. Guyton AC, Hall JE. Dominant Role of the Kidneys in Long-Term Regulation of Arterial Pressure an in Hypertension: The Integrated System for Pressure Control.

- In Guyton AC, Hall JE, eds. Textbook of Medical Physiology. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000:221-234.
22. Navar LG. The Kidney in Blood Pressure Regulation and Development of Hypertension. *Med Clin North Am.* 1997;81:1165-1198
23. Nakamura T, Alberola AM, Salazar FJ, Saito Y, Kurashina T, Granger JP, et al. Effects of Renal Perfusion Pressure on Renal Interstitial Hydrostatic Pressure and Na<sup>+</sup> Excretion: Role of Endothelium Derived Nitric Oxide. *Nephron.* 1998;78:104-111
24. Kimura G, Brenner BM. A Method for Distinguishing Salt-Sensitive From Non-Salt-Sensitive Forms of Human and Experimental Hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2:341-349
25. Gong R, Dworkin LD, Brenner BM, Maddox DA: The Renal Circulation and Glomerular Ultrafiltration; en Brenner BM (ed): Brenner and Rector's The Kidney. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Elsevier, 2008, Vol. 1, pp. 91-120
26. Watson RD, Stallard TJ, Flinn RM, Littler WA. Factors Determining Direct Arterial Pressure and Its Variability in Hypertensive Man. *Hypertension.* 1980;2:333-341
27. Julius S. The Evidence for a Pathophysiologic Significance of the Sympathetic Overactivity in Hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1996;18:305-321
28. Littler WA, Honour AJ, Sleight P. Direct Arterial Pressure and Electrocardiogram During Motor Car Driving. *Br Med J.* 1973;2:273-277
29. Williamson OK. Arterial Blood Pressure Records Before and After Muscular Exertion. *Br Med J.* 1909;1(2513):530

30. Franco M. Mecanismos de Autorregulación Renal. Principia Cardiológica. 1994;3:59-70
31. Myers BD, Deen WM, Brenner BM. Effects of Norepinephrine and Angiotensin II on the Determinants of Glomerular Ultrafiltration and Proximal Tubule Fluid Reabsorption in the Rat. *Circ Res.* 1975;37:101-110
32. Cowley AW, Mattson DL, Lu S, Roman RJ. The Renal Medulla and Hypertension. *Hypertension.* 1995;25(4):663-673
33. Faubert PF, Chou SY, Porush JG. Regulation of Papillary Plasma Flow by Angiotensin II. *Kidney Int.* 1987;32:472-478
34. Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GF, Rodríguez-Iturbe B. Subtle Acquired Renal Injury as a Mechanism of Salt Sensitive Hypertension. *N Engl J Med.* 2002;346(12):913-923
35. Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson RJ. Salt-Sensitive Hypertension Develops After Short-Term Exposure to Angiotensin II. *Hypertension.* 1999;33:1013-1019
36. Johnson RJ, Gordon KL, Suga S, Duijvestijn AM, Griffin K, Bidani A. Renal Injury and Salt-Sensitive Hypertension After Exposure to Catecholamines. *Hypertension.* 1999;34:151-159
37. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga S, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennet W, Schreiner GF, Johnson RJ. Post-Cyclosporin-Mediated Hypertension and Nephropathy: Amelioration by Vascular Endothelial Growth Factor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F727-F736

38. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension. *Hypertension*. 1992;20:298-303
39. Rodríguez-Iturbe B. Renal Infiltration of Immunocompetent Cells: Cause and Effect of Sodium-Sensitive Hypertension. *Clin Exp Nephrol*. 2010;14:105-111
40. Rodríguez-Iturbe B. El Papel de la Infiltración Renal de Células Inmunocompetentes en la Patogenia de Hipertensión Arterial. *Nefrología*. 2008;28(5):483-492
41. Svendsen UG. Evidence for an Initial, Thymus Independent and a Chronic, Thymus-Dependent Phase of DOCA and Salt Hypertension in Mice. *Abstract. Acta Path Microbiol Scand*. 1976;84:523-528.
42. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of T Cells in the Genesis of Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204:2449-2460
43. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincón J, Chávez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate Mofetil Prevents Salt-Sensitive Hypertension Resulting from Nitric Oxide Synthesis Inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281:F38-F47
44. Allison AC, Eugui RM. Mycophenolate Mofetil and its Mechanism of Action. *Immunopharmacology*. 2000;47:85-118
45. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Gordon K, Rincón J, Chávez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ. Mycophenolate

- Mofetil Prevents Salt-Sensitive Hypertension Resulting from Angiotensin II Exposure. *Kidney Int.* 2001;59:2222-2232
46. Franco M, Martínez F, Quiroz Y, Galicia O, Bautista R, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Renal Angiotensin II Concentration and Interstitial Infiltration of Immune Cells are Correlated with Blood Pressure Levels in Salt-Sensitive Hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R251-R256
47. De Miguel C, Das S, Lund H, Mattson DL. T Lymphocytes Mediate Hypertension and Kidney Damage in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298:R1136-R1142
48. Cheung BM. Blockade of the Renin-Angiotensin System. *Hong Kong Med J.* 2002;8(3):185-191
49. Naftilan AJ, Zuo WM, Ingelfinger J, Ryan TJ, Pratt RE, Dzau VJ. Localization and Differential Regulation of Angiotensinogen mRNA Expression in the Vessel Wall. *J Clin Invest.* 1991;87(4):1300. Abstract
50. Dzau VJ. Tissue Renin Angiotensin System in Myocardial Hypertrophy and Failure. *Arch Intern Med.* 1993;153(8):937. Abstract
51. Kifor I, Moore TJ, Fallo F, Sperling E, Chiou CY, Menachery A, Williams GH. Potassium-Estimulated Angiotensin Released from Superfused Adrenal Capsules and Enzymatically Dispersed Cells of the Zona Glomerulosa. *Endocrinology.* 1991;129(2):823. Abstract
52. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous Angiotensin Concentration in Specific Intrarenal Fluid Compartments of the Rat. *J Clin Invest.* 1990;86:1352-1357

53. Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, Bonet L, Chávez M, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, Pons HA. Reduction of Renal Immune Cell Infiltration Results in Blood Pressure Control in Genetically Hypertensive Rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282:F191-F201
54. Bravo Y, Quiroz Y, Ferrebuz A, Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate Mofetil Administration Reduces Renal Inflammation, Oxidative Stress, and Arterial Pressure in Rats with Lead-Induced Hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F616-F623
55. Vanegas V, Ferrebuz A, Quiroz Y, Rodríguez-Iturbe B. Hypertension in Page (Cellophan-Wrapped) Kidney is due to Interstitial Nephritis. *Kidney Int.* 2005;68:1161-1170
56. Herrera J, Ferrebuz A, García-McGregor E, Rodríguez-Iturbe B. Mycophenolate Mofetil Treatment Improves Hypertension in Patients with Psoriasis and Rheumatoid Arthritis. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:S218-S225
57. Rodríguez-Iturbe, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative Stress, Renal Infiltration of Immune Cells, and Salt Sensitive Hypertension: All for One and One for All. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F606-F616
58. Wang CT, Chin SY, Navar LG. Impairment of Pressure-Natriuresis and Renal Autoregulation in ANG II Infused Hypertensive Rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F319-F325

59. Rincón J, Parra G, Quiroz Y, Benatuil L, Rodríguez-Iturbe B. Cyclosporine A reduces the expression of adhesion molecules in the kidney of rats with chronic serum sickness. *Clin Exp Immunol.* 1991;83:510-515
60. Schneider MP, Inscho EW, Pollock DM. Attenuated Vasoconstrictor Responses to Endothelin in Afferent Arterioles During a High-Salt Diet. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(4):F1208-1214
61. Welch WJ, Wilcox CS. Macula Densa Arginine Delivery and Uptake in the Rat Regulates Glomerular Capillary Pressure. Effects of Salt Intake. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2235-2242
62. Malamos B, Dontas AS, Koutras DA, Marketos S, Sfontouris J, Papanicolaou N. The Determination of Glomerular Filtration Rate in Clinical Practice. *Lancet.* 1966;1(7444):943-945
63. Espinel CH. The FENa Test. Use and the Differential Diagnosis of Acute Renal Failure. *JAMA.* 1976;236(6):579-581
64. Obrador GT, García-García G, Villa AR, Rubilar X, Olvera N, Ferreira E, Virgen M, Gutiérrez-Padilla JA, Plascencia-Alonso M, Mendoza-García M, Plascencia-Pérez S. Prevalence of Chronic Kidney Disease in the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) México and Comparisons With KEEP US. *Kidney Int.* 2010;77(Suppl 116):S2-S8
65. Eugui EM, Allison AD. Immunosuppressive Activity of Mycophenolate Mofetil. *Ann NY Acad Sci.* 1993;685:309-329

66. Navar LG. The Role of The Kidneys in Hypertension. *J Clin Hypertens.* 2005;7:542-549
67. Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Swelborn MB III, Modrall JG. Angiotensin II Exerts Positive Feedback on the Intrarenal Renin-Angiotensin System by an Angiotensin Converting Enzyme-Dependent Mechanism. *J Surg Res.* 2005;129:272-277
68. Franco M, Martínez F, Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ, Santamaría J, Montoya A, Nepomuceno T, Bautista R, Tapia E, Herrera-Acosta J. Angiotensin II, Interstitial Inflammation, and the Pathogenesis of Salt-Sensitive Hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291:F1281-F1287