

11262
32



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD

PARTICIPACION DE LA ANGIOTENSINA II Y LA INFILTRACION INFLAMATORIA TUBULOINTERSTICIAL EN LA HEMODINAMICA RENAL EN UN MODELO DE HIPERTENSION ARTERIAL SENSIBLE A SAL.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
PRESENTADO POR:
DR. ROGELIO MONREAL PUENTE

DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
"IGNACIO CHAVEZ"

TUTOR RESPONSABLE: DRA. MARTHA FRANCO G.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2003



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

A mi esposa Adriana quien mantiene la homeostasis del hogar dentro de la autorregulación. A mis hijos Rogelio Adrián y César Eduardo, quienes como vasos pre y posglomerulares se encargaron de mantener el manuscrito con alegría.

A mi tutora Dra. Martha Franco, de quien aprendí la profesionalidad de la ciencia e investigación.

A las personas que sembraron en mi la inquietud de conocer sobre la hipertensión arterial: JWR, ACG, LGN, JHA.

A la fuente de toda ciencia y sabiduría quien nos permitió contestar una pregunta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

Introducción.....	4
Pregunta de Investigación.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Material y métodos.....	24
Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	35
Discusión.....	50
Conclusión.....	59
Bibliografía.....	60

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN.

La hipertensión arterial constituye un grave problema de salud pública por su alta relevancia y por la gravedad de sus complicaciones tardías (1). En México, en la encuesta NDEC se encontró una prevalencia del 45% en individuos mayores de 40 años (2), además la hipertensión se encuentra entre las principales causas de muerte (3), con una tasa de mortalidad de 9.6/100000 habitantes en México (2). Además, la hipertensión arterial es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedad coronaria, cardiopatía hipertensiva, accidente vascular cerebral, retinopatía y nefropatía. Por lo anterior, el estudio de la patogenia de la hipertensión arterial adquiere gran relevancia.

Por otra parte, la asociación entre la ingesta alta en sal y la hipertensión arterial es bien conocida. La ingesta alta de sal se considera como uno de los principales factores ambientales que influyen sobre la presión arterial. La prevalencia de hipertensión arterial esencial es mayor en sociedades donde el consumo de sal es alrededor de los 100 mEq/día (2.3g de sodio); en contraste, sociedades en donde la ingesta es menor de 50 mEq/día presentan menos casos de hipertensión arterial. El promedio de consumo de sal en las sociedades industrializadas es de 100 a 250 mEq/día (2.3 a 5.7 de sodio o de 6 a 15 g de NaCl), con una mayor incidencia de efectos adversos cardiovasculares en lugares donde el consumo de sal es mayor a los 500 mEq/día (4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La hipertensión arterial sensible a sal se define como un incremento de la presión arterial media mayor de 10 mmHg al ingerir una dieta alta en sodio después de recibir una dosis de diurético y dieta hiposódica (5). Se conoce que en los pacientes menores de 40 años con hipertensión arterial la sensibilidad a sal es del 50 %, con un incremento en la frecuencia hasta el 80% en los pacientes mayores de 60 años, lo que indica que la sensibilidad a sal se adquiere con la edad y sin embargo, los mecanismos involucrados en el desarrollo de la sensibilidad a la sal son poco conocidos.

Una de las hipótesis más importantes sobre la generación de la hipertensión arterial se basa en la existencia de una anomalía de la función renal. Si esta alteración es la causa o el resultado sigue siendo un tema de controversia sin embargo, la evidencia científica señala al riñón como responsable del control de la presión sistémica, la génesis y mantenimiento de la hipertensión arterial (6, 7), lo que hace necesario comprender la fisiopatología de la hipertensión arterial. Los mecanismos que intervienen en el control de la presión arterial son múltiples y se han clasificado de acuerdo al tiempo en que inician su activación como lo muestra la figura 1. Existe un control a corto plazo que actúa en segundos y minutos ante cambios de la presión arterial, entre los cuales se encuentran el sistema nervioso central, los baro y quimiorreceptores y cuyo efecto es de poca duración. Los mecanismos de acción intermedia actúan en horas como el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el mecanismo que actúa a largo plazo en días y semanas, encontrándose este en el riñón mediante su capacidad de excretar sodio y agua. Todos estos mecanismos se han evaluado contra su capacidad o "ganancia" (corrección), para normalizar la presión arterial en el tiempo, ante un cambio de la misma: mostrando así la

capacidad del riñón de mantener y reintegrar la presión arterial a valores normales con una ganancia infinita (6). Así Guyton creo el concepto del sistema riñón-líquidos corporales en la regulación de la presión arterial. De tal manera que modificaciones en la PA se reflejan en el volumen extracelular, volumen sanguíneo, resistencias periféricas y gasto cardiaco, los cuales se modifican hasta normalizar la PA. Estos a su vez, se ven influenciados por factores neurohumorales, produciendo así un sistema de control con ganancia infinita.

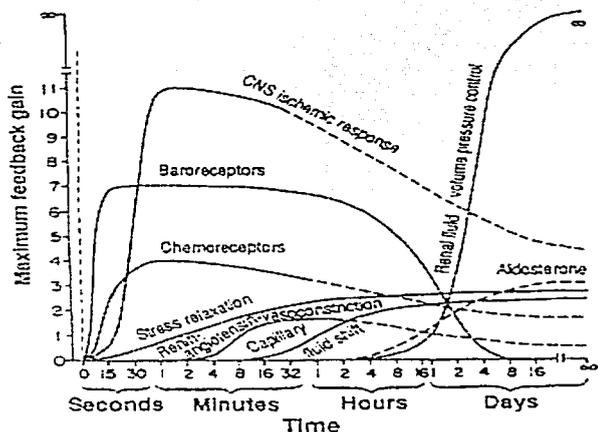


Figura 1. Relación de los sistemas de regulación de la presión arterial con su ganancia en el tiempo.

En este contexto, cuando la presión arterial disminuye por debajo de 60 mmHg la excreción de sodio se detiene, sin embargo a medida que la PA aumenta la

excreción de sodio y agua aumenta progresivamente hasta encontrar el punto de equilibrio, conociéndose este fenómeno como natriuresis de presión. La figura 2 muestra la curva de función renal o de natriuresis representando la relación normal entre la presión arterial y la excreción renal de sodio. Cuando existe algún factor que altera la función renal, el mecanismo de natriuresis de presión continua siendo efectivo; sin embargo ha desviado la curva a la derecha desplazando el punto de equilibrio, con lo cual los cambios de la regulación de la presión arterial partirán de ese punto con retención o excreción de agua y sodio. Entre los factores que pueden desviar la curva hacia la derecha se encuentran básicamente el sistema simpático, el efecto de la angiotensina sobre el riñón y la aldosterona.

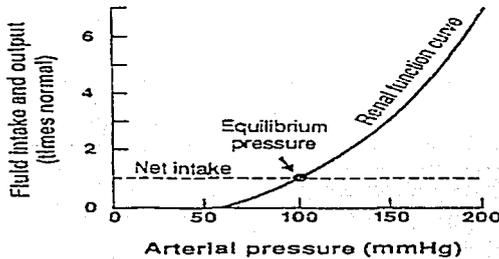


Figura 2. Curva de función renal o de natriuresis.

De manera, que cuando se administra una carga crónica de sal, existen variaciones muy pequeñas en la presión arterial y la concentración de sodio, esto debido a un aumento en la excreción de sodio y agua, mostrando así una curva mas vertical con ganancia infinita representada en la figura 3. Esto es producido por un aumento en la presión de perfusión renal, traduciéndose en una elevación de la presión arterial

en respuesta a un aumento del volumen extracelular, que a su vez aumenta el flujo sanguíneo renal y produce una disminución de la secreción de renina, y con ello de angiotensina y de la secreción de aldosterona; todo esto contribuye a la disminución de la absorción de sodio y agua en los segmentos tubulares de la nefrona, aumentando la excreción de sodio y agua (7).

Es bien conocido, que en hipertensión arterial la curva de natriuresis esta desplazada a la derecha, es decir, se requiere una presión de perfusión renal más alta para mantener una excreción de sodio normal; esto implica la existencia de un defecto en la excreción renal de sodio y agua; ante un aumento en la ingesta de sal se requiere un aumento mayor de presión arterial para mantener el balance entre la ingestión y la excreción.

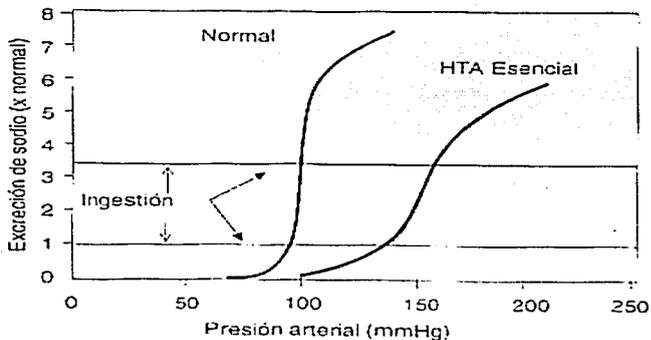


Figura 3. Relación de la ingestión, excreción de sodio y presión arterial.

En condiciones normales los cambios de presión arterial no alteran la función renal puesto que el riñón es capaz de adaptarse a estos cambios manteniendo constantes el flujo y la filtración glomerular. Esto se debe al mecanismo de autorregulación renal, que esta integrado a su vez por: 1) la capacidad intrínseca que poseen los vasos preglomerulares de contraerse o dilatarse ante cambios de presión de perfusión para conservar el flujo de una manera constante y 2) el sistema de retroalimentación túbuloglomerular que regula el tono de la arteriola aferente en respuesta al aporte de sodio al túbulo distal (macula densa), es decir, a menor llegada de sodio responde con vasoconstricción aferente y viceversa. El mecanismo de autorregulación renal opera principalmente en la corteza renal, sin embargo, en la médula renal la capacidad de autorregulación es menos eficiente, lo cual favorece la natriuresis. Como se muestra en la figura 4, a mayor presión de perfusión aumenta el flujo sanguíneo a la medula, lo que se transmite a los vasos peritubulares produciendo una disminución de la osmolaridad en el intersticio lo que limita la salida de sodio y agua de la rama descendente del asa de Henle y a los segmentos tubulares distales y por lo tanto aumenta la excreción urinaria de sodio y agua (8, 9).

NATRIURESIS DE PRESIÓN MECANISMO DE ACCIÓN

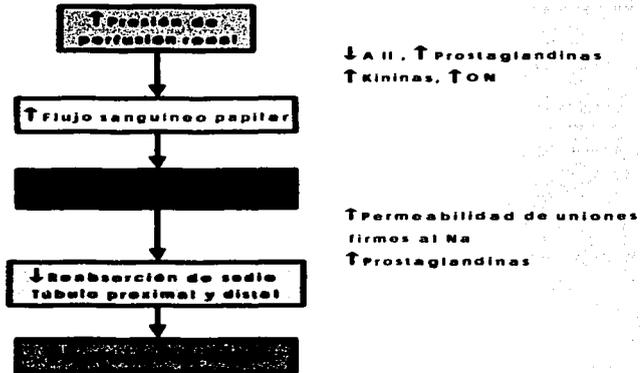


Figura 4. Mecanismo de natriuresis de presión.

Hace algunos años Johnson y Schreiner propusieron una hipótesis para explicar la sensibilidad a sal que se desarrolla con la edad (10). Estos autores proponen en un inicio existen elevaciones episódicas de la presión arterial, en presencia de una función renal conservada; estas elevaciones son cada vez más frecuentes, produciendo lesión de los capilares peritubulares renales con rarefacción de los mismos e isquemia medular, lo que condiciona una lesión túbulointersticial sin alteraciones glomerulares (figura 5).

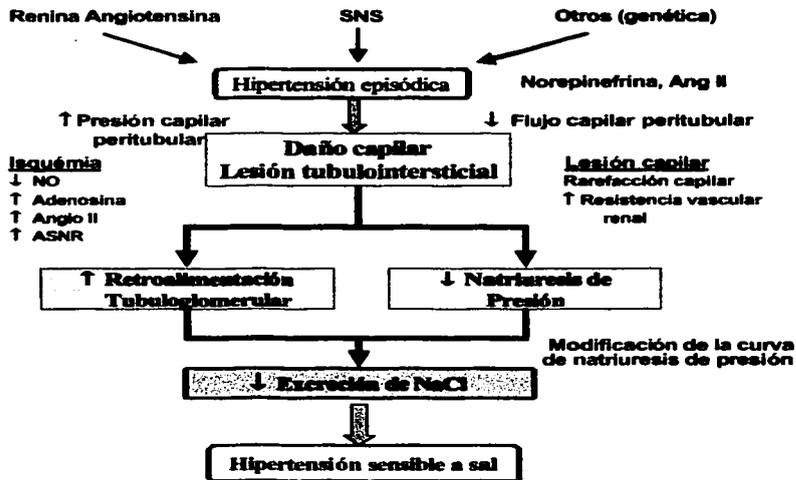


Figura 5. Hipótesis propuesta para la generación de hipertensión sensible a sal.

Desde hace más de 50 años, se ha sugerido que la exposición temporal a Angiotensina II (Ang II) produce hipertensión arterial permanente (11). De hecho, cuando se induce hipertensión arterial mediante la estenosis de una de las arterias renales, el riñón estenótico libera grandes cantidades de renina y angiotensina produciendo hipertensión aguda; la liberación de la estenosis en forma temprana normaliza la presión arterial. Sin embargo, cuando la estenosis permanece por tiempo prolongado, ocurren cambios en el riñón contralateral que hacen que la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hipertensión persista, aún después de liberar la estenosis (12-14). Inicialmente en el modelo de Goldblatt , se propuso que el desarrollo de cambios estructurales en el riñón contralateral eran los responsable de perpetuar la hipertensión (11); las lesiones habituales después de una hipertensión severa y sostenida son la lesión de los vasos preglomerulares con hialinosis de los mismos, cambios glomerulares y túbulo intersticiales; sin embargo, no siempre se observan alteraciones histológicas severas, a menudo sólo existen alteraciones focales como atrofia y dilatación tubular, así como infiltración de macrófagos y depósito de colágena (14,16). También se ha involucrado la disminución de la permeabilidad del capilar glomerular en el riñón expuesto a la hipertensión después de extirpar el riñón estenótico (15).

Por otra parte, la Angiotensina II (Ang II) proviene de acción enzimática de la enzima convertidora de angiotensina sobre la angiotensina I y esta a su vez de la conversión del angiotensinógeno por la renina (figura 6). Se han identificado 2 subtipos de receptores por los cuales la Ang II ejerce sus efectos, los receptores AT1 que se encuentran en un 70% y los receptores AT2 en un 30%. La mayoría de los efectos de la Ang II son mediados a través de los receptores AT1. Además el péptido ejerce poderosos efectos en muchos tejidos vasculares y sistemas orgánicos como vasoconstricción (renal, coronaria y cerebral), estimulación de la liberación de aldosterona y catecolaminas, produce sed y apetito por la sal, y favorece la reabsorción de sodio y agua por el riñón y el intestino. Además, actualmente se reconocen sus efectos locales: se considera un factor de crecimiento, tiene propiedades proliferativas, mitogénias, induce estrés oxidativo y estimula la producción de endotelina. A nivel renal, la concentración de Ang II es mucho mayor que la concentración sistémica siendo esta hasta 1000 veces mayor.

Trabaja con
FALTA DE CUIDADO

En el riñón los efectos de la Ang II son muy importantes; a través del receptor AT1 modifica substancialmente los determinantes de la filtración glomerular. Así, disminuye el flujo plasmático renal al producir vasoconstricción aferente y eferente, aumenta la presión intracapilar y disminuye el coeficiente de ultrafiltración o Kf por contracción de células mesangiales. En el túbulo estimula el intercambiador Na^+/H^+ con reabsorción de sodio en el túbulo proximal y excreción de uratos, inhibe la secreción de renina e interactúa con factores de crecimiento (17, 18). Estos cambios son debidos a que el sistema se activa como un mecanismo para mantener el volumen sanguíneo circulante reteniendo sodio y agua a través del riñón evitando así la hipoperfusión tisular. Se ha descrito que los receptores AT2 pueden tener un efecto modesto vasodilatador, inhiben la proliferación celular y factores de crecimiento, además puede contrarrestar los efectos de los receptores AT1, sin embargo aún esto se encuentra bajo investigación (19).

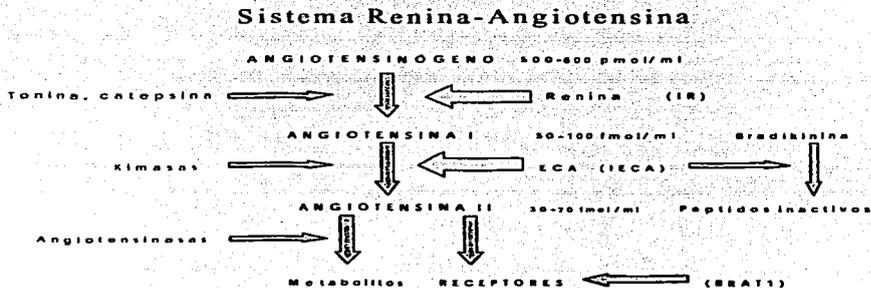


Figura 6. Esquema del Sistema Renina-Angiotensina.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Para estudiar los mecanismos involucrados en el desarrollo de hipertensión sensible a sal Johnson y Lombardi desarrollaron un modelo de hipertensión dependiente a sal en ratas por medio de una infusión temporal (14 días) de Ang II (20). La presión arterial en este modelo se elevó inicialmente como consecuencia de la acción de la angiotensina y regresó a valores normales al suspender el vasoconstrictor, produciendo proteinuria durante el tiempo de administración de Ang II que regreso a valores normales al retirar la infusión. Cuando se inició una dieta alta en sal (4% de NaCl) posterior a la exposición de Ang II, la presión arterial se elevó progresivamente, manteniéndose así hasta por siete semanas; en cambio, en los animales que recibieron la infusión de Ang II y posteriormente una dieta hiposódica la presión arterial se mantuvo normal, demostrando así la sensibilidad a la sal (20). Los estudios histológicos demostraron hipertrofia de las arteriolas preglomerulares, preservación de las estructuras glomerulares y cambios túbulo intersticiales caracterizados por infiltración de linfocitos, monocitos y macrófagos los cuales en estudios de inmunohistoquímica fueron positivos para Ang II, asociados con la expresión de moléculas de adhesión y de osteopontina (un factor quimiotáctico); también se observó disminución de la sintetasa de óxido nítrico en células endoteliales y evidencia de isquemia en células tubulares, así como aumento en la producción de radicales libres de oxígeno (20). Zou y cols (24) han demostrado que la infusión de Ang II aumenta tanto la angiotensina endógena y exógena intrarrenal. A pesar de que la Ang II exógena suprime la producción de renina intrarrenal, existe un aumento en la actividad de la enzima convertidora de Angiotensina que se ha localizado en los sitios de lesión intersticial produciendo Ang II.

CLASO C.V.
FALTA DE URGEN

Se han desarrollado otros modelos de hipertensión sensible a sal con infusión de catecolaminas (21), inhibidores de óxido nítrico (22), cargas hiperproteicas (23) siguiendo el mismo tipo de protocolo de dieta alta en sal, en todos ellos se encontró el mismo patrón de lesión. En todos los modelos se desarrolló proteinuria transitoria infiltración túbulointerstial.

La infiltración túbulo intersticial observada en estos modelos de lesión renal por hipertensión hasta ahora no se le había atribuido relevancia. Es bien conocido que el proceso inflamatorio invariablemente se asocia a un aumento en la generación local de sustancias vasoactivas como entre ellas la Ang II; a través de su efecto vasopresor estas sustancias vasoactivas pueden modificar la hemodinámica glomerular y limitar la excreción renal de sodio. Además de un aumento de la actividad de la enzima convertidora de Angiotensina localizado en los sitios de lesión intersticial capaz de producir Angiotensina II (24). En otros estudios se ha documentado que después de la infusión de Ang II cuando se administra una dieta alta en sal existe un número importante de células infiltrantes medidas por inmunofluorescencia indirecta en áreas túbulointersticiales que son positivas para Ang II indicando que estas células son una fuente adicional de Ang II (25, 26). La Ang II ejerce un efecto proliferativo celular y constituye un estímulo importante para la liberación de factores de crecimiento (FC) como la interleucina 1, el FC derivado de plaquetas, el FC endotelial y el FC similar a insulina etc.; en esta forma, la Ang II modula la proliferación celular en el proceso inflamatorio. Finalmente, a través de oxidasa de nicotinamida adenin dinucleótido reducido, la Ang II es capaz de generar radicales libres de oxígeno y de esa forma aumentar el daño tisular (27-28).

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

La contribución de la infiltración celular de linfocitos y macrófagos en el desarrollo de hipertensión sensible a sal no se ha estudiado por completo. A este respecto, se conoce que en otros modelos de daño renal progresivo con reducción severa de la masa renal, la disminución de la infiltración de monocitos y linfocitos con inmunosupresores disminuye la progresión del daño renal sin modificar la hipertensión arterial sistémica o la hipertrofia glomerular (29-32). La utilización de drogas que impiden la infiltración celular permite evaluar la contribución del proceso inflamatorio en la generación de hipertensión sensible a sal, entre ellas el mofetil micofenolato, un inmunosupresor utilizado en el trasplante de órganos (33, 34) que ejerce un efecto antiproliferativo en monocitos y macrófagos, produce inhibición de las moléculas de adhesión, lo que puede limitar la migración de linfocitos y otras células inflamatorias sin tener efecto en la función renal. El mecanismo por el cual el micofenolato mofetil ejerce su acción es por medio del ácido micofenólico, un inhibidor de la inosin 5'-monofosfato deshidrogenasa, la cual controla la síntesis de guanosin trifosfato. El MMF depleta la reserva de guanosin trifosfato en los linfocitos y monocitos y suprime la síntesis de novo de purinas, por lo tanto ejerce una actividad selectiva y antiproliferativa reversible sobre estas células. Además, suprime la expresión de moléculas de adhesión intercelulares, las cuales son críticas para la migración de leucocitos de la circulación y su subsecuente acumulación en los tejidos (35).

Rodríguez-Iturbe y Quiroz (22, 36) han evaluado la contribución de las células inflamatorias de la lesión túbulointersticial en la generación de hipertensión sensible a sal administrando MMF durante el periodo de infusión de Ang II. No se evitó la elevación de la presión arterial durante la infusión de Ang II, sin embargo sí previno la hipertensión durante el periodo de dieta alta en sal, previniendo adicionalmente la

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

hipertrofia de los vasos preglomerulares, disminuyendo la infiltración celular local, el daño túbulointersticial, el número de células positivas para Ang II y la presencia de radicales libres de oxígeno. Por otra parte Franco et al (25), encontró que los cambios en la hemodinámica renal se prevenían en el grupo al que se le administró micofenolato mofetil, existiendo menor resistencia aferente, mayor flujo plasmático y filtración glomerular por nefrona que el grupo que solo recibió la infusión de Ang II. Estos datos sugieren que la hipertensión arterial sensible a sal resultante de la infusión de Ang II está asociada a la infiltración túbulointersticial debido a que el mofetil micofenolato previno el desarrollo de hipertensión sensible a sal aunque la presión fue mayor que el grupo control.

La mayoría de los autores se han enfocado principalmente en el mecanismo de natriuresis producido a nivel tubular, dando poco valor a una posible participación glomerular, ya que generalmente no se han observado cambios estructurales glomerular en todos los modelos desarrollados para estudiar la hipertensión arterial sensible a sal. Sin embargo uno de los mecanismos capaces de contribuir al aumento a la sensibilidad a sal en este modelo de hipertensión es la vasoconstricción cortical, un mecanismo no estudiado hasta ahora. En estudios recientes de nuestro laboratorio (25) se han observado las alteraciones hemodinámicas que ocurren en este modelo, documentando que durante la administración de Ang II existe vasoconstricción renal muy importante, sin embargo, después de suspender la Ang II y posterior de una y 5 semanas de dieta alta en sal las alteraciones de la hemodinámica glomerular persistieron durante la fase de hipertensión sensible a sal, un periodo en el que la ingestión de sal disminuye la actividad del sistema renina-angiotensina (17): estos cambios consistieron en una disminución del flujo plasmático

glomerular (35%) y del coeficiente de ultrafiltración (30%) produciendo una disminución del 32% de la filtración glomerular por nefrona. A pesar de la disminución del flujo plasmático la presión capilar glomerular se elevó por aumento en la resistencia de la arteriola eferente; estas alteraciones hemodinámicas contribuyen a disminuir la excreción de sal. Es relevante mencionar que, las alteraciones de la hemodinámica glomerular fueron prevenidos con la administración de mofetil micofenolato después de 5 semanas de dieta alta en sal y los animales no desarrollaron sensibilidad a sal. Estos cambios parecen ser de naturaleza funcional ya que no se observaron alteraciones histológicas glomerulares, sin embargo, contribuyen al desarrollo de la hipertensión sensible a sal. La persistencia de la activación del sistema renina Angiotensina local, la disminución de la producción de óxido nítrico o la producción de otras sustancias vasoconstrictoras como la endotelina por las células inflamatorias de la lesión túbulointersticial pueden mediar las alteraciones de la microcirculación renal, sin embargo no se han caracterizado los mediadores vasoactivos responsables de las alteraciones glomerulares en el desarrollo de sensibilidad a sal.

La vasoconstricción renal se ha sugerido como el mecanismo responsable del desarrollo de la sensibilidad a sal en hipertensión; puesto que el sistema renina angiotensina intrarrenal parece estar involucrado en las alteraciones de la hemodinámica glomerular en la fase tardía de la hipertensión sensible a sal, una forma de evaluar los efectos del sistema es a través de fármacos inhibidores que bloquean la acción de la enzima convertidora de Angiotensina o por bloqueo específico de sus receptores AT1 de la Angiotensina II.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Entre los fármacos bloqueadores del receptor AT1 se encuentran el losartán, ibersartán y candesartan entre otros, los cuales provienen de derivados sustituidos del grupo benzylimidazol, y se caracterizan por tener una alta selectividad, gran biodisponibilidad con potente y larga actividad antagonista en el receptor AT1 de la Angiotensina II (37). Estos medicamentos inicialmente se han empleado como antihipertensivos, sin embargo existen investigaciones donde evalúan los efectos fisiológicos y patológicos de la Angiotensina II cuando se inhibe sobre órganos específicos (17,18).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

- 1.- ¿Es la Angiotensina II la responsable de los cambios en la hemodinámica renal (vasoconstricción cortical) en el modelo de hipertensión sensible a sal?

- 2.- ¿Son las células inflamatorias del infiltrado túbulointersticial las responsables de la producción de Angiotensina II intrarrenal y por lo tanto mediadoras de los cambios en la hemodinámica renal (vasoconstricción cortical) en este modelo de hipertensión sensible a sal?

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

JUSTIFICACIÓN.

Dada la importancia de la hipertensión arterial como un problema de salud pública y causa importante de muerte debido a sus complicaciones, es fundamental conocer los mecanismos fisiopatológicos involucrados en su patogénesis. Se considera que su origen es multifactorial, en el que participan factores genéticos, influencia del medio ambiente y alteración de los mecanismos que regulan la presión arterial.

La ingesta alta de sal está íntimamente relacionada con el desarrollo de hipertensión arterial. Hasta un 50 a 60% de los pacientes con hipertensión arterial esencial son susceptibles al efecto perjudicial de la sal, además la sensibilidad a sal es un factor de riesgo independiente para una mayor morbimortalidad en comparación con los no sensibles a sal (38). Dado que los mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipertensión sólo se conocen parcialmente, el desarrollo de un modelo experimental en el cual la infusión temporal de la Ang II exógena puede inducir hipertensión sensible a sal permitirá estudiar los mecanismos responsables de la disminución en la excreción renal de sal que conduce al desarrollo de la hipertensión (presión arterial sistólica mayor de 140 mmHg); específicamente la participación de mediadores vasoactivos capaces de alterar la hemodinámica glomerular como la Angiotensina II en un período tardío, después de 5 semanas de dieta alta en sal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS.

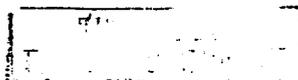
1.- La Angiotensina II en el modelo de hipertensión sensible a sal, es el mediador responsable de los cambios hemodinámicos glomerulares (vasoconstricción cortical), puesto que al bloquear el receptor AT1 de Angiotensina II con Candesartan corrige la vasoconstricción cortical renal.

2.- Al disminuir la infiltración inflamatoria tubulointerstitial con Mofetil Micofenolato se produce menor cantidad de Angiotensina II intrarrenal previniendo así la vasoconstricción cortical y los cambios hemodinámicos glomerulares, siendo estas células mediadoras de la vasoconstricción cortical en el modelo de hipertensión sensible a sal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS.

- 1.- Evaluar la contribución de la Angiotensina II en las alteraciones hemodinámicas glomerulares (vasoconstricción cortical renal) en la hipertensión sensible a sal mediante el bloqueo agudo de los receptores AT1 de Ang II con Candesartan.
- 2.- Evaluar la contribución de la infiltración inflamatoria tubulointerstitial en la vasoconstricción cortical y producción de Angiotensina II intrarrenal, disminuyendo esta infiltración con Mofetil Micofenolato y observando los cambios hemodinámicos glomerulares posterior al bloqueo agudo del receptor AT1 de Ang II con Candesartan en este modelo de hipertensión sensible a sal.



MATERIAL Y MÉTODOS.

AREA DE ESTUDIO.

Es un estudio experimental enfocado al área de causalidad.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

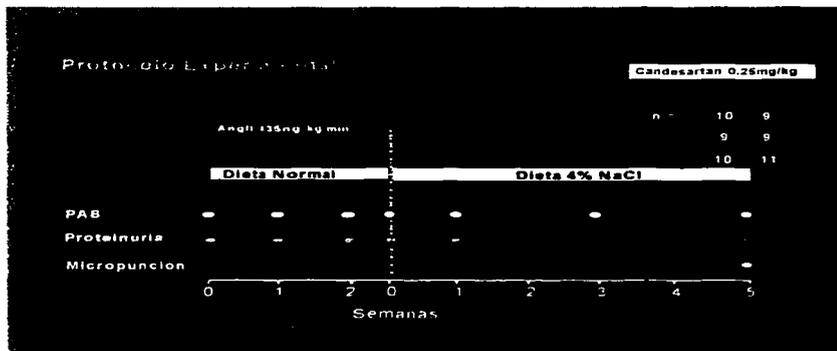
Se utilizaron 10 ratas Sprague-Dawley de 290 a 310 gramos de peso por grupo. El grupo 1 y 2 (Ang II + DAS y Ang II + DAS + Candesartan) se les indujo hipertensión arterial mediante la administración de Ang II (435 ng/kg/min) por medio de una minibomba osmótica que se colocó en el tejido subcutáneo del dorso del animal, mediante anestesia general con éter etílico y bajo condiciones de esterilidad. La minibomba se retiró el día 14 del estudio y se dejó 5 días de descanso para eliminación de la Angiotensina II residual; a partir del día 19 del estudio se inició una dieta alta en sal (4% NaCl) y los animales se siguieron durante 5 semanas. Los grupos 3 y 4 (Ang II + MMF +DAS y Ang II + MMF + DAS + Candesartan) se les administró al mismo tiempo que la minibomba de Ang II micofenolato mofetil a dosis de 30 mg/kg/día mediante la utilización de sonda orogástrica. Los grupos control o sham 5 y 6 (Control +DAS y Control + DAS + Candesartan) se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico sin colocación de la minibomba iniciando la dieta alta en sal en el mismo periodo y durante 5 semanas. Al término del mismo se les realizaron los estudios de micropunción renal. La contribución de Angiotensina II en la patogenia de la hipertensión sensible a sal se evaluó de manera aguda con una infusión del antagonista respectivo durante los estudios de micropunción: infusión de

candesartan (bolo de 0.25 mg/kg) en los grupos II, IV y VI y se compararán con los grupos que solo recibirán la infusión de Ang II, Ang II más micofenolato mofetil y el grupo control, grupos I, III y V respectivamente.

Se estudió la evolución de la presión arterial en condiciones basales y durante el seguimiento como lo muestra la figura 4; se midieron los determinantes de la hemodinámica glomerular mediante técnicas de micropunción al final de las 7 semanas cuando las ratas desarrollaron por completo la hipertensión sensible a sal. Se recolectará orina de 24 horas cada 2 semanas y 2 días antes de los estudios de micropunción para determinación de proteínas (figura 4).

Los estudios se efectuaron de la siguiente manera:

Figura 4.



Medición de la presión arterial:

Se midió la presión arterial sistólica en ratas conscientes, colocadas en una jaula de restricción y mediante pletismografía con un manguito colocado en la cola de la rata y se graficó en un polígrafo (Narco Biosystems USA).

Recolección de orina de 24 horas:

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas con agua y comida ad libitum y se recolectará la orina.

Estudios de micropunción renal:

El día del experimento, la rata se anestesió con pentobarbital sódico (30 mg/kg intraperitoneal), administrando dosis suplementarias de acuerdo a requerimientos. La rata se colocó en una mesa termostregulada manteniendo su temperatura a 37°C. Con tubo de polietileno, se cateterizaron la tráquea (PE 240), ambas venas yugulares (PE 50) y ambas arterias femorales (PE50) así como el uretero izquierdo (PE 10). El riñón izquierdo se expuso mediante una incisión de lumbotomía, se disecó la grasa subyacente y se colocó en una cápsula de lucita; se sella con agar al 4%, se cubre con solución salina tibia y se ilumina con una fuente de luz fría. La presión arterial se midió de manera continua mediante un transductor de presión (Spectronics, modelo P23XL USA) y se graficó en un polígrafo (Grass Instruments USA). Se tomaron muestras

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de sangre y de orina cada 45-60 min y se repuso el volumen con sangre de una rata donadora. Las ratas se mantuvieron eurolémicas mediante la infusión de plasma isotónico (10 ml/kg) durante la cirugía seguido de una infusión de polifructosán al 10% (Inutest, Fresenius Pharma, Austria) a una velocidad de 2.5 ml/h. Después de 60 minutos de equilibrio se tomaron 7 muestras cronometradas de líquido tubular del segmento proximal, para determinar el flujo tubular y la concentración de polifructosán. Se midieron la presión tubular al flujo libre en 7 túbulos, la presión glomerular mediante la técnica de bloqueo de flujo en 7 nefronas con micropipeta conectada a un equipo "Servo Null" (Servo nulling pressure system, Instruments for physiology and Medicine USA) y se registraron en el polígrafo. La presión coloidosmótica glomerular se evaluó en la sangre tomada de la arteria femoral y de las arteriolas eferentes. Se midieron la concentración plasmática y urinaria de polifructosán de las muestras tomadas durante el periodo de micropunción. Estas mediciones se efectuaron en los grupos I, III y V, y con la administración de candesartan (pelo de 0.25 mg/kg) en los grupos II, IV y VI.

Las concentraciones de polifructosán se determinaron por la técnica de Davison y Sackner (39). El volumen de líquido recolectado de túbulos proximales individuales se midió estimando la longitud de la columna de fluido en un capilar de cuarzo de diámetro constante y conocido. La concentración de polifructosán en el líquido tubular se midió por el micrométodo de Vurek y Pegram (40). La concentración de proteínas en plasma aferente y eferente se midió por el micrométodo de Viets y cols (41). La proteinuria de 24 horas se cuantificó mediante la técnica turbidimétrica del ácido tricloroacético de Henry (42). La filtración glomerular total y por nefrona, la presión capilar glomerular, la fracción de filtración por nefrona, el flujo sanguíneo y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

plasmático por nefrona, las resistencias aferente y eferente, la presión coloidosmótica y el coeficiente de ultrafiltración glomerular se calculan con ecuaciones conocidas (43).

CÁLCULOS DE LOS ESTUDIOS DE MICROPUNCIÓN RENAL.

$$\text{Presión oncótica } (\pi) = 1.76 C + 0.28 C^2$$

$$\text{Filtración Glomerular por nefrona (SNGFR) nl/min} = (TF/P)_{in} \cdot V_{in}$$

$$\text{Presión capilar glomerular } (P_{CG}) \text{ mmHg} = SFP + \pi \cdot \alpha$$

$$\text{Presión efectiva de filtración (PEF)} = \frac{(P_{CG} - \pi_G - FF) + (P_{CO} - \pi_{CO} - FF)}{2}$$

$$\text{Coeficiente de permeabilidad } (K_f) \text{ nl.s.mmHg} = \frac{\text{SNGFR}}{\text{PEF}} \cdot 60$$

$$\text{Fracción de filtración por nefrona (SNFF)} = 1 - \frac{CA}{CE}$$

$$\text{Flujo plasmático por nefrona } (Q_n) \text{ nl/min} = \frac{\text{SNGFR}}{\text{SNFF}}$$

$$\text{Flujo sanguíneo por nefrona (GBF) nl/min} = \frac{QA}{1 - Hct_0}$$

$$\text{Resistencia aferente } (R_a) \text{ dyn.s.cm}^{-5} = \frac{MAP - P_{CG}}{GBF} \cdot (7.962)$$

$$\text{Resistencia eferente } (R_e) \text{ dyn.s.cm}^{-5} = \frac{P_{CG} - P_{CO}}{GBF \cdot \text{SNGFR}} \cdot (7.962)$$

$$\text{Presión Hidráulica transcápilar } (HP) \text{ mmHg} = P_{CG} - P_{CO}$$

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN EN

Donde:

C= Concentración de proteínas

FF= Free flow o flujo tubular

P= Plasmática

TF= Flujo Tubular

SFP= Stop Flow pressure o presión tubular con flujo detenido

CA= Concentración de proteínas aferente

CE= Concentración de proteínas eferente

QA= Flujo plasmático

QBS= Flujo sanguíneo glomerular

PT= Presión tubular o free flow

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 1. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Categoría	Escala de Medición
Presión Arterial	Fuerza o presión que ejerce la sangre sobre las paredes arteriales.	Presión arterial sistólica tomada de la cola de la rata. Rango normal de 100 a 139 mmHg. Alta o hipertensión es mayor o igual a 140 mmHg.	Numerica	Milímetros de mercurio (mmHg).
Proteinuria	Presencia de proteínas plasmáticas en la orina.	Presencia de albumina en orina de 24 horas. Rango normal menor de 0 a 15 mg/24 horas. Proteinuria es indicador de daño renal.	Numerica	Miligramos en 24 horas.
Hemodinámica Renal	Cambios hemodinámicos que ocurren durante el proceso de filtración glomerular (cantidad de sangre filtrada de una sustancia por unidad de tiempo) la cual esta determinada por: 1) Flujo plasmático renal. 2) Coeficiente de permeabilidad o ultrafiltración. 3) Presión intraglomerular. 4) Resistencia pre y postglomerular.	<i>Filtración Glomerular</i> es la resultante del producto de la concentración de una sustancia en la orina por el volumen urinario dividido entre la concentración plasmática por unidad de tiempo ($U_x \cdot V/P_x$)	Numerica	Mililitros por minuto ml/min.
		<i>Flujo plasmático por nefrona</i> (GFR) es el resultado de la tasa de filtración glomerular por nefrona entre la fracción de filtración SNGFR/SNF	Numerica	Centimilitros por minuto ml/min.
		<i>Coeficiente de Ultrafiltración</i> (K) es el resultado de la tasa de filtración glomerular por nefrona entre la presión efectiva de filtración SNGFR/P _{eff} 750	Numerica	Millilitros por superficie por milímetro de mercurio ml/minHg
		<i>Presión intraglomerular</i> igual a la presión hidrostática más la oncótica capilar y del espacio de Bowman.	Numerica	Milímetros de mercurio mmHg
		<i>Resistencia preglomerular</i> es el equivalente de la resistencia de arteriola aferente siendo esta el resultado de la diferencia de la presión arterial media y la presión glomerular dividida entre el flujo sanguíneo por nefrona por la constante (7.962) $\frac{MAP-P_{GFR}}{GFR} \times (7.962)$	Numerica	dinas por centímetro a la menos 5 Dyn/cm ⁵
<i>Resistencia postglomerular</i> es el equivalente de la resistencia de la arteriola eferente siendo esta el resultado de la diferencia de la presión plasmática menos la presión en la sistólica dividida entre la diferencia del flujo sanguíneo por nefrona y la tasa de filtración glomerular por nefrona por la constante $\frac{P_{sist}-P_{GFR}}{GFR} \times (7.962)$	Numerica	dinas por centímetro a la menos 5 Dyn/cm ⁵		

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

1.- Variable dependiente o de respuesta:

Vasodilatación cortical renal y cambios hemodinámicos glomerulares secundarios al bloqueo del receptor AT1 de Angiotensina II. (variables numéricas continuas).

2.- Variable independiente o explicatoria:

Vasoconstricción cortical renal debida a estimulación del receptor AT1 de Angiotensina II producida por infiltración inflamatoria renal y asociada a hipertensión sensible a sal (variable numérica continua).

3.- Los resultados tanto en las tablas como en las figuras son expresados con la media \pm Error Estándar de la Media (SEM).

4.- El análisis estadístico fue hecho con el programa de software comercial GraphPad Prism 2.01 1996.

5.-Se realizaron medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, error estándar, intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación). A los datos dentro de los grupos de les realizó una prueba de normalidad utilizando la prueba de distancia de Kolmogorov-Smirnov asumiendo una distribución normal cuando la suma del valor de $p \geq 0.05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.- Para la comparación de grupos con y sin Candesaratan se utilizó la una prueba de T no pareada de una cola para muestras independientes utilizando corrección de Welch cuando las diferencias en las desviación estándar eran significativas, dado que los grupos presentaron una distribución que sigue el teorema del limite central y se realizaron evaluaciones en grupos diferentes de ratas.

7.- En caso de análisis entre grupos se utilizó análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguida de posprueba de Tukey como prueba de comparación múltiple de medias.

8.- Se aceptó un nivel de significancia de $p < 0.05$.

9.- Cálculo del tamaño de la muestra: Se tomó en cuenta las diferencias esperadas en la variable principal de respuesta al candesaratan que es la Filtración Glomerular por nefrona del grupo problema que es el de Angiotensina II, el grupo con Angiotensina II y Mofetil Micofenolato y grupo control. Se especifico una α de 0.05 y de β 0.2 (poder de $1-\beta$).

Para el caso de grupos independientes para comparación de medias para 2 muestras con distribución normal a dos colas (56).

$$n = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{\Delta^2}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Donde:

n	Tamaño de la muestra de cada grupo
Zα	Valor de Z (número de desviaciones estándar) para la probabilidad de α (error tipo I)
Zβ	Valor de Z (número de desviaciones estándar) para la probabilidad de β (error tipo II)
σ	Desviaciones estándar de la variable base
μ_1	Controles
μ_2	Casos
σ^2	Varianza del grupo
Δ	Diferencia de las medias de los grupo ($\mu_1 - \mu_2$)

Para el grupo con Angiotensina II se requiere 6.91 ratas. Con 9 ratas se obtiene un poder mayor al 90%.

$$\alpha = 0.001 \quad Z\alpha = 3.5$$

$$\beta = 0.2 \quad Z\beta = 0.84$$

$$\mu_1 = 25.92$$

$$\mu_2 = 33.14$$

$$\sigma_1^2 = 11.189$$

$$\sigma_2^2 = 7.969$$

$$\frac{(19.15) - (18.8356)}{52.1284} = 6.91$$

Para el grupo con Angiotensina II + MMF se requieren de 6.28 ratas.

$$\alpha = 0.0032 \quad Z\alpha = 2.49$$

$$\beta = 0.2 \quad Z\beta = 0.84$$

$$\mu_1 = 33.14$$

$$\mu_2 = 24.21$$

$$\sigma_1^2 = 7.969$$

$$\sigma_2^2 = 37.23$$

$$\frac{(45.199) - (11.0889)}{79.74} = 6.28$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el grupo control se requieren 9.85 ratas. Con 8 ratas se obtiene un poder del 74%.

$$\alpha = 0.023 \quad Z\alpha = 1.99$$

$$\beta = 0.2 \quad Z\beta = 0.84$$

$$\mu_1 = 4.686$$

$$\mu_2 = 5.198$$

$$\sigma_1^2 = 34.86$$

$$\sigma_2^2 = 28.55$$

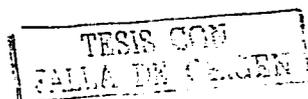
$$\frac{(21.958) - (8.0089)}{39.81} = 9.85$$

CONSIDERACIONES GENERALES.

Las mediciones y métodos están probados por la literatura y son de uso estándar para evaluación de resultados de estudios. El laboratorio de nefrología además cuenta con estándares propios para validación de sus mediciones. Se cuenta con personal especializado para la elaboración de micropipetas y los instrumentos para la realización del estudio y medición se encuentran dentro del Instituto Nacional de Cardiología. Las bombas de infusión así como la Angiotensina, mofetil micofenolato, candesartan y el resto del material son proporcionados tanto por el departamento de nefrología del instituto como por CONACyT grant 30605M.

ESPECIFICACIONES BIOÉTICAS Y DE SEGURIDAD.

El protocolo se apega a las normas de cuidados y usos de animales de laboratorio recomendadas por el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y el National Institutes of Health.



RESULTADOS

Presión Arterial Sistólica.

El grupo I de Angiotensina II (All) y dieta alta en sal (DAS) consistió de 10 ratas, el grupo II de All con DAS y Candesartan (C) de 9 ratas, el grupo III con All, mofetil micofenolato (MMF) y DAS de 9 ratas, el grupo IV con All, mofetil micofenolato (MMF), DAS y C de 9 ratas, el grupo V Sham de 9 ratas y el grupo VI Sham y C de 11 ratas.

Angiotensina II	10 ratas.
Angiotensina II + Candesartan	9 ratas.
Ang II + MMF	9 ratas.
Ang II + MMF + candesartan	9 ratas.
Control	10 ratas.
Control + candesartan	11 ratas.

Tabla 2. Número de ratas por grupo.

La evolución de la presión arterial sistólica se muestra en la figura 7. La presión arterial aumentó progresivamente durante la infusión de All siendo esta máxima a los 14 días (121 ± 3.5 basal vs. 139 ± 3.8 All vs. 190 ± 6.5 All+MMF mmHg), y regresando a valores basales posteriormente al retiro de la minibomba, tanto en los grupos que solo recibieron All (135 ± 4.5 mmHg) como en los grupos con All y MMF (130 ± 3.2 mmHg). Posterior al retiro de la infusión de All y después del 5 días de periodo de lavado se inició DAS mostrando en el grupo con All un aumento progresivo de la presión arterial

hasta llegar a niveles de 160 ± 3.2 mmHg. En el grupo que recibió All y MMF aunque la presión arterial no se comportó como el grupo control se previno la hipertensión arterial quedando con una presión de 134 ± 1.7 mmHg. El grupo control permaneció normotenso durante todo el periodo del estudio presión arterial de 122 ± 2.02 mmHg.

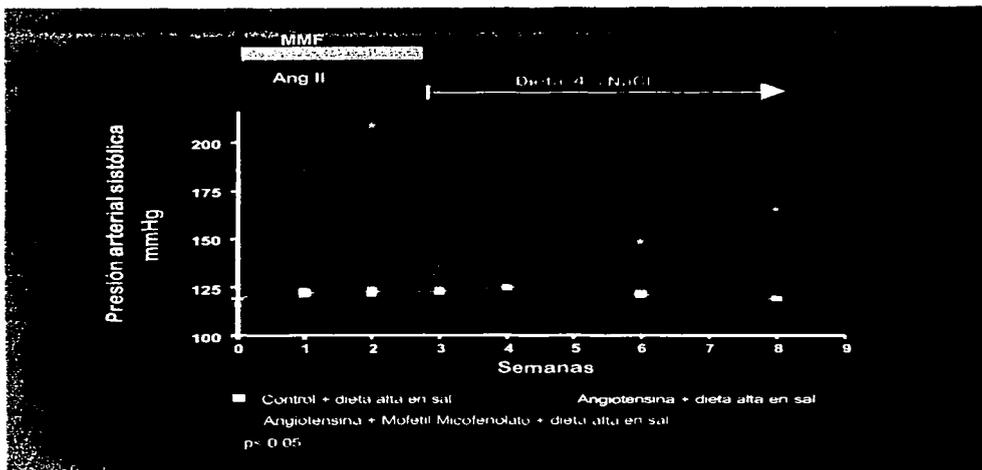


Figura 7. Presión arterial sistólica durante el periodo de estudio.

* p < 0.05

Proteinuria.

Las ratas que recibieron solamente la infusión de All mostraron un aumento significativo de la proteinuria (70.2 ± 8.1), la cual retorno a niveles basales posterior al retiro de la All permaneciendo así durante la DAS (13.2 ± 0.9). En las ratas con All y MMF la proteinuria fue significativamente menor que las ratas que recibieron solamente All pero mayor que las ratas control (42.5 ± 2.9), retornando a niveles basales posterior al retiro de la infusión de All y permaneciendo así durante la DAS (12.4 ± 1.07). (figura 8).

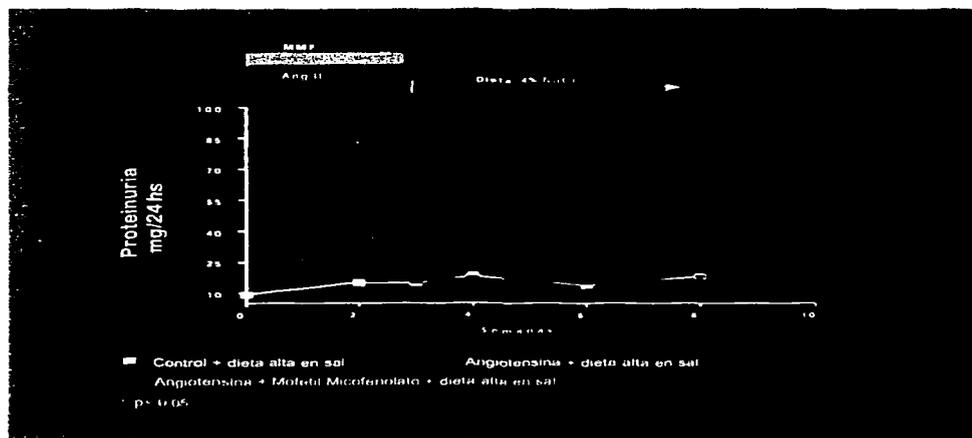


Figura 8. Relación de proteinuria durante el periodo de estudio.

* $p < 0.05$

Peso.

El peso de las ratas se comportó de manera similar en todos los grupos, sin ser el peso corporal un factor determinante en los resultados como se muestra en la figura 9.

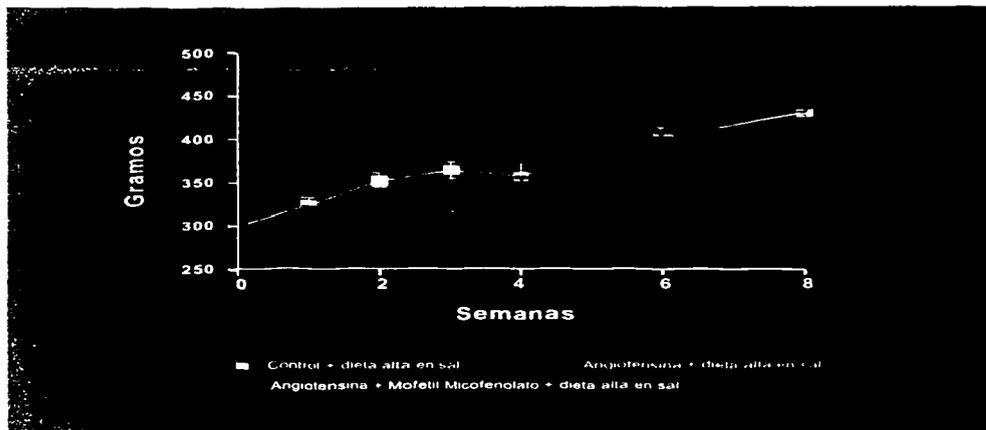


Figura 9. Evolución del peso durante el periodo de estudio.

EFFECTOS DEL CANDESARTAN.

Presión Arterial Media.

La presión arterial media fue de (125.5 ± 0.6 Sham vs. 157.8 ± 0.9 AngII vs. 134.1 ± 0.4 AngII+MMf mmHg) durante el periodo de equilibrio y disminuyó significativamente en todos los grupos posterior a la administración del bolo de candesartan (108 ± 1.41

Sham vs 126 ± 0.5 AngII vs 117 ± 0.47 AngII+MMF mmHg). Se observó una disminución más pronunciada en el grupo que solo recibió la infusión de Angiotensina II (figura 10).

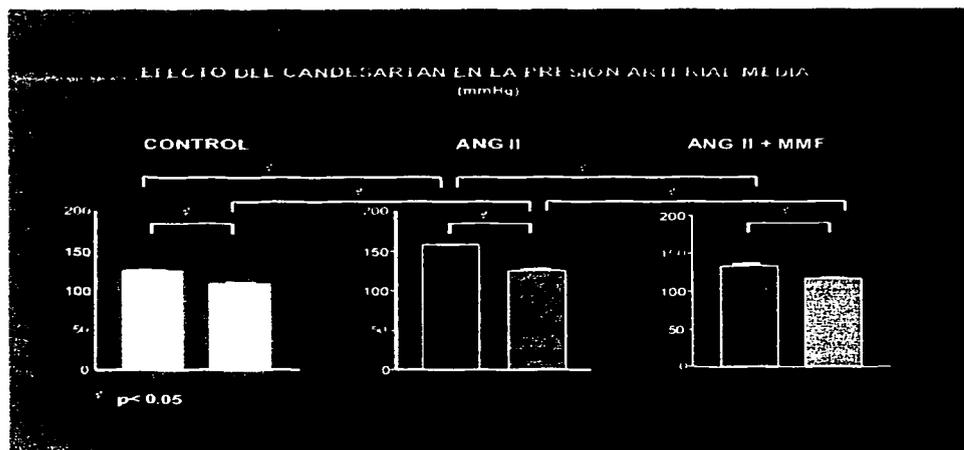


Figura 10. Representación de la presión arterial media pre y post administración de candesartan.

*= $p < 0.05$

Se realizó análisis estadístico para evaluar las diferencias en la disminución de la PAM en respuesta al candesartan teniendo una caída significativa el grupo con HTSS (AngII) en relación con el grupo control, no existió diferencias entre el grupo control y MMF (figura 11).

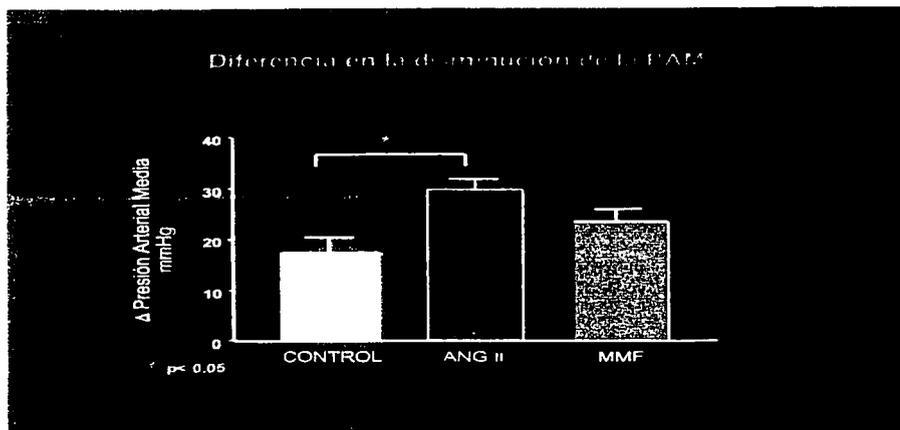


Figura 11. Diferencia en la disminución de la presión arterial media posterior a la administración de candesartan.

*=p<0.05

Hemodinámica Renal.

No se observaron diferencias en la filtración glomerular total FGT en los 3 grupos antes de la administración de candesartan; sin embargo se observó en el grupo con Ang II un aumento significativo de la FGT posterior al bloqueo del receptor AT1, no existiendo cambios entre los grupos control y MMF (figura 12).

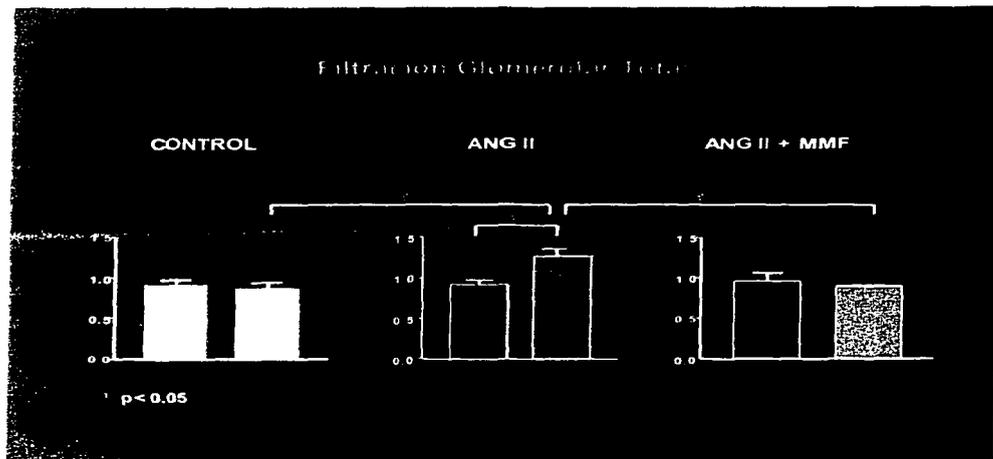


Figura 12. Filtración glomerular total antes y después de la administración de candesartan.

*=p<0.05

La filtración glomerular por nefrona (FGN) en el grupo que desarrolló HTSS se encontró significativamente disminuida en relación con los otros dos grupos antes de la administración de candesartan. Con el bloqueo del receptor AT1 se observó una disminución significativa de la FGN en los grupos control y MMF, sin embargo en el grupo que recibió solo Ang II la FGN aumentó significativamente. (figura 13).

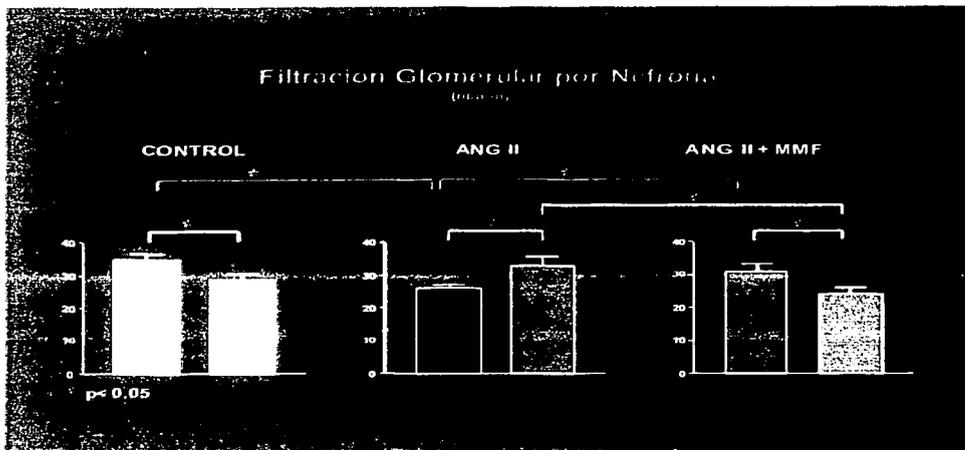


Figura 13. Filtración glomerular por nefrona.

*= $p < 0.05$

El flujo plasmático glomerular (QA) se encontró disminuido en el grupo con HTSS en relación al grupo control. Con la administración de candesartan el QA disminuyó significativamente en los grupos control y MMF, sin embargo en el grupo con Ang II se observó un aumento significativo. Este aumento fue diferente con el QA del grupo con MMF posterior al bloqueo del receptor AT₁, pero no fue diferente del grupo control (figura 14).

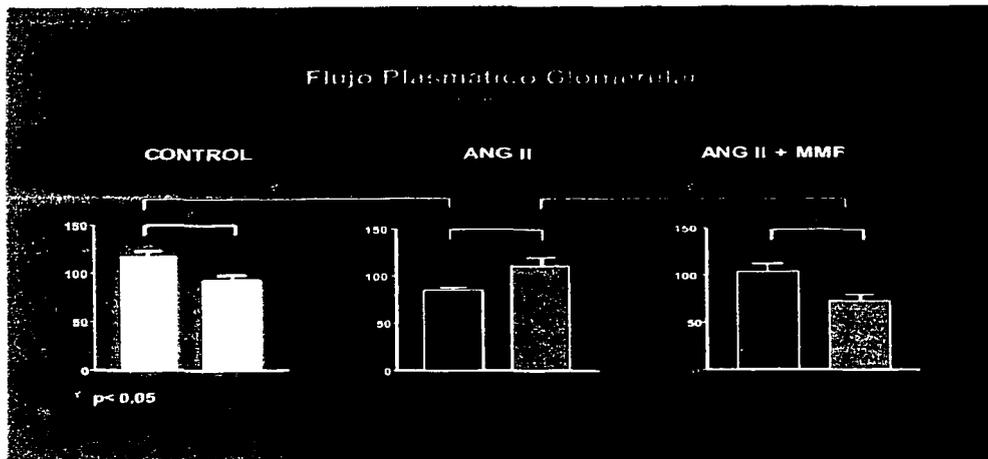


Figura 14. Flujo plasmático Glomerular.

*= $p < 0.05$

La resistencia de la arteriola aferente (RA) en el grupo con HTSS se encontró significativamente aumentada en relación al grupo control y MMF antes de la administración de candesartan, además en el grupo con MMF se observó un aumento en la RA en relación al grupo control. Con el bloque del receptor AT1 de Ang II en el grupo con HTSS la RA disminuyó de manera significativa con valores similares al grupo control. No se presentaron cambios en la RA en los grupos control y MMF. La RA del grupo con MMF y candesartan persistió más alta que el grupo con All y el control (figura 15).

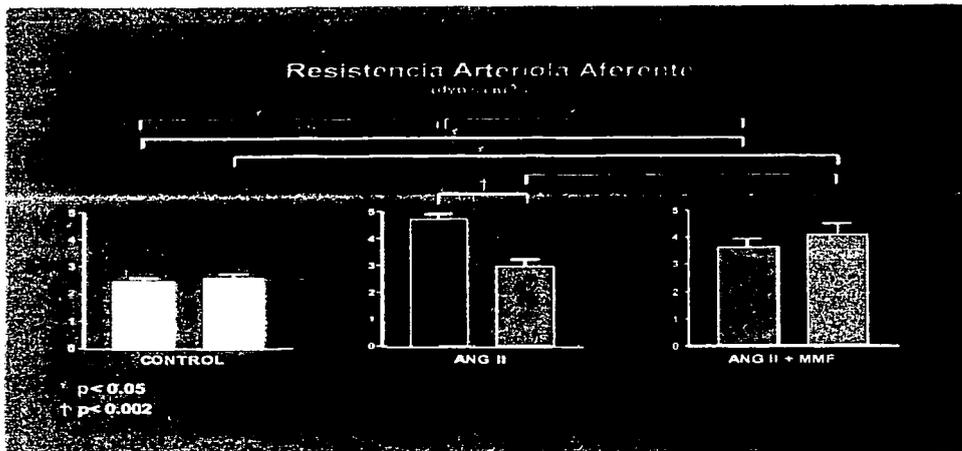


Figura 15. Resistencia arteriola aferente.

La resistencia de la arteriola eferente (RE) en el grupo con HTSS se encontró aumentada en relación al grupo control y no fue diferente del grupo con MMF antes de la administración con candesartan. Al bloquear el receptor AT₁ de Ang II solo existió una disminución significativa en el grupo con All sin haber modificaciones en los grupos control y MMF (figura 16).

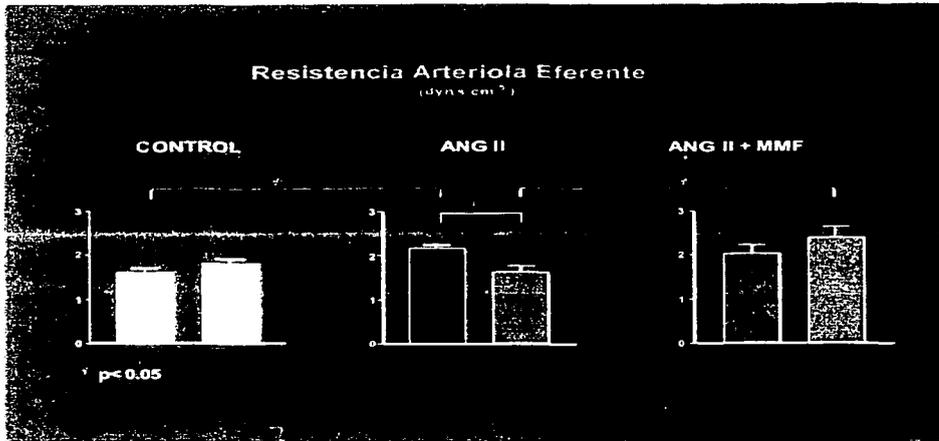


Figura 16. Resistencia arteriola eferente.

La presión capilar glomerular (PCG) fue similar en todos los grupos antes de la administración de candesartan. Cuando se administró el bloqueador AT1 disminuyó la PCG significativamente en los grupos control y MMF siendo diferente en este último grupo a la del grupo con Ang II (figura 17).

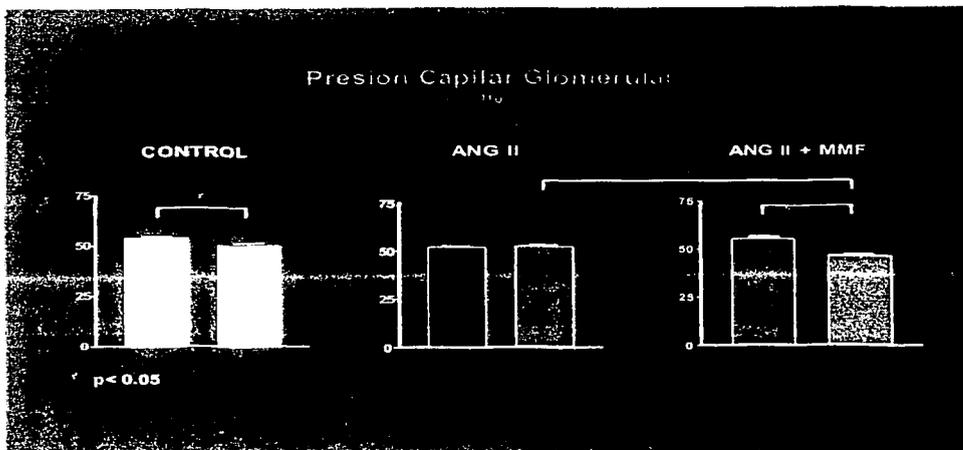


Figura 17. Presión capilar glomerular antes y después de la administración de candesartan.

*= $p < 0.05$

El coeficiente de ultrafiltración (Kf) en el grupo con HTSS se encontró disminuido comparado con los grupos control y MMF en el primer periodo. Después de la administración con candesartan el grupo control y MMF presentaron una disminución significativa del Kf y aumentó en el grupo con Ang II (figura 18).

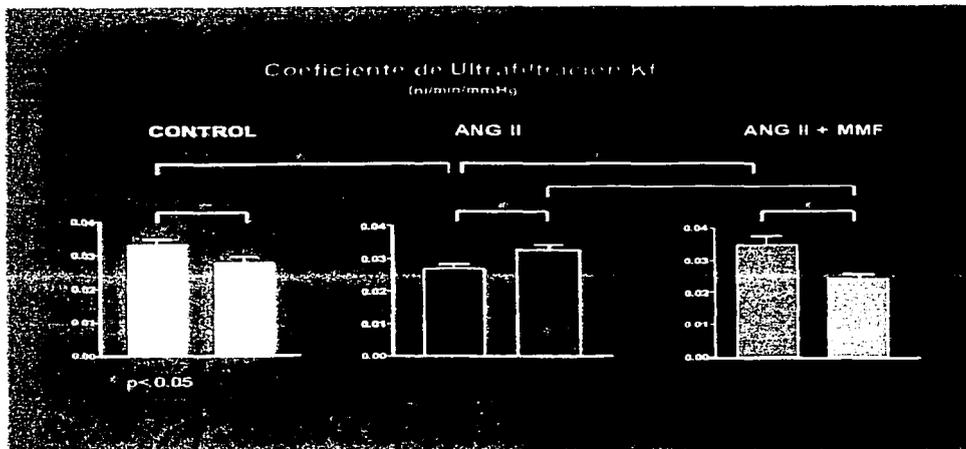


Figura 18. Coeficiente de Ultrafiltración o Kf.

En el grupo con HTSS, se observó una disminución de la filtración glomerular por nefrona (SNGFR) y del flujo plasmático renal con un aumento en las resistencias aferente y eferente, además de disminución del coeficiente de ultrafiltración Kf, demostrando que existe vasoconstricción cortical renal en el grupo con HTSS; Estas alteraciones de la hemodinámica renal contribuyen a la sensibilidad a sal en este modelo. En el grupo que recibió Ang II + MMF y DAS el comportamiento de la hemodinámica renal fue similar al observado en el grupo control, con lo que se previno la sensibilidad a sal. Con la administración de candesartan en las ratas con HTSS los cambios hemodinámicos renales se corrigieron, lo que indica la participación de la Ang II en la vasoconstricción cortical. El grupo con MMF al prevenir la infiltración

inflamatoria y con la administración de candesartan la hemodinámica renal se comportó similar a el grupo control, lo que sugiere la participación de la infiltración inflamatoria en la producción de la Ang II intrarrenal y con ello inducir vasoconstricción cortical favoreciendo la sensibilidad a sal de la hipertensión arterial.

Los resultados de las covariables en los estudios de micropunción renal se muestran en la tabla 3. Los efectos posteriores a la administración del Bloqueador del receptor AT1 de Ang II se resumen en la tabla 4.

GRUPO	n	π_a	π_e	PCPT	PIT	ΔP
CONTROL	10	17.96 ± 0.58	30.24 ± 0.91	13.57 ± 0.50	12.16 ± 0.36	40.86 ± 0.84
CONTROL + C	11	14.41 ± 0.57 ^a	23.73 ± 0.93 ^a	14.60 ± 0.55	13.13 ± 0.50	36.72 ± 1.06 ^a
ANG II	10	17.03 ± 0.35	29.38 ± 0.81	14.64 ± 0.38	11.64 ± 0.40	40.00 ± 0.96
ANG II + C	9	16.43 ± 0.41	27.18 ± 0.80	15.40 ± 0.70	13.50 ± 0.41	38.68 ± 0.78
ANG II + MMF	9	18.04 ± 0.65	33.66 ± 1.48	14.60 ± 0.14	13.00 ± 0.41	42.20 ± 1.15
ANG II + MMF + C	9	13.92 ± 0.51 ^c	26.35 ± 1.45 ^c	13.50 ± 0.54	11.80 ± 0.52	36.23 ± 0.76 ^c

Tabla 3. Datos de las mediciones de la hemodinámica renal en cuanto peso corporal, π_a y π_e presión oncótica aferente y eferente, PCPT presión del capilar peritubular, PIT presión intratubular, ΔP gradiente de presión hidrostática capilar glomerular. C candesartan, Ang II Angiotensina II, MMF mofetil micofenolato. ^a=p<0.05 versus control. ^b= p<0.05 versus Ang II. ^c= p<0.05 versus Ang II + MMF. Representados con media ± error estándar.

TESIS CON
VALIA DE ORDEN

	CONTROL	ANG II	ANG II + MMF
FGN	↓	↑	↓
QA	↓	↑	↓
PCG	↓	↔	↓
RA	↔	↓	↔
RE	↔	↓	↔
KF	↓	↑	↓

Tabla 4. Efectos posteriores a la administración de Candesartan

DISCUSIÓN.

La lesión tubulointerstial y la vasoconstricción cortical renal que se observan en la hipertensión sensible a sal experimental participan en forma fundamental en el desarrollo de la sensibilidad a sal (3,8); los mediadores vasoconstrictores producidos por las células inflamatorias se han propuesto como responsables de las alteraciones renales (7,17,18).

La exposición temporal de Ang II en ratas produce hipertensión arterial durante la infusión del péptido, la cual regresa a valores cercanos a lo normal después de suspender la infusión, esto se asocia con daño tubulointerstial e hipertrofia de la arteriola aferente, sin lesiones glomerulares aparentes (20). Cuando las ratas son expuestas a una dieta alta en sodio existe una elevación progresiva de la presión arterial desarrollándose la sensibilidad a sal. Los estudios hemodinámicos renales en ratas con HTSS demuestran que la vasoconstricción renal se caracteriza por aumento en la resistencia de las arteriolas aferente y eferente, disminución del flujo plasmático renal, disminución del coeficiente de ultrafiltración lo que da como resultado una disminución de la filtración glomerular por nefrona (25).

De acuerdo con lo anterior, en estudios histológicos y funcionales renales en sujetos con HTA, se ha documentado que existe hipertrofia y vasoconstricción inadecuada de la arteriola aferente (50, 51), con reducción del flujo sanguíneo renal (47). Estas alteraciones se han atribuido a una deficiencia del mecanismo de autorregulación renal que permite la transmisión de la presión sistémica al glomérulo. Los cambios

estructurales y funcionales de los vasos preglomerulares pueden afectar el mecanismo de natriuresis de presión (6-8, 10, 52) y facilitar el desarrollo de HTSS: 1) por una parte, producen isquemia persistente en la médula renal, que induce la expresión de mediadores locales que pueden favorecer a un incremento directo de la reabsorción tubular de sodio (53), o bien, 2) a través de inducir vasoconstricción renal pueden ocasionar una disminución del flujo plasmático glomerular, del coeficiente de ultrafiltración y de la filtración glomerular por nefrona, lo que limita la carga de sodio que puede ser filtrada (25), y de esta manera alterar la curva de natriuresis.

Al administrar concomitantemente mofetil micofenolato durante la infusión de Angiotensina II y en el periodo de lavado, a pesar de que el fármaco no evita la hipertensión durante la exposición a Ang II, se previene la infiltración inflamatoria, y con ellos la vasoconstricción cortical y el desarrollo de la sensibilidad a sal (22,25,36). A este respecto, se ha postulado que las células inflamatorias tubulointersticiales son las responsables de la producción de varios factores vasoactivos ,(57) como son la Angiotensina II, la endotelina, especies reactivas de oxígeno, isoprostanos, etc. Por tal motivo, se ha asociado la lesión tubulointersticial con el desarrollo y mantenimiento de la HTSS.

Este estudio propone la existencia de una disfunción del sistema Renina-Angiotensina, que resulta en una sobreproducción renal de Angiotensina II, que mantiene la vasoconstricción renal en una fase tardía de hipertensión sensible a sal, así como la participación del proceso inflamatorio inducido por el péptido en la vasoconstricción cortical renal que se observa en la HTSS experimental. Para ello, se

bloquearon selectivamente los receptores AT1 de Angiotensina II con candesartan en forma aguda, lo que nos permite estudiar los principales efectos del péptido sobre la hemodinámica renal y la presión arterial sistémica en este modelo.

La administración de candesartan produjo una reducción significativa de la presión arterial en todos los grupos; sin embargo, en el grupo con HTSS (Ang II+DAS) la disminución fue de mayor magnitud. En este grupo la administración de candesartan corrigió la presión arterial a niveles normales, con una respuesta vasodilatadora renal caracterizada por disminución de las resistencias aferente y eferente, aumento del flujo plasmático glomerular y del coeficiente de ultrafiltración, lo que produjo como resultado un aumento de la filtración glomerular por nefrona. Esta respuesta vasodilatadora se ha reportado incluso con dosis bajas de candesartan en ratas Sprague-Dowley sanas (58), también se ha observado disminución de la filtración glomerular por nefrona, asociada a una reacción adrenérgica debida a caída importante de la presión arterial que se observa al utilizar dosis altas del fármaco; sin embargo, en las ratas con HTSS el candesartan a la dosis utilizada, produjo aumento de la filtración glomerular por nefrona, lo que traduce una mayor eficiencia del mecanismo de autorregulación (59). Es conocido que en condiciones en donde la Ang II intrarrenal se encuentra aumentada, existe un incremento en la sensibilidad del mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular vía receptor AT1 que produce una vasoconstricción exagerada de la arteriola aferente (69), por lo que el bloqueo del receptor induce una disminución de la respuesta (normalización del mecanismo) (70), y por consiguiente aumento de la FGN (71). Por otra parte, la ausencia de cambios en la presión capilar glomerular pueden explicarse por el aumento significativo del flujo plasmático glomerular con vasodilatación de la arteriola

eferente. Estos resultados indican que la Ang II intrarrenal participa importantemente en la generación de la vasoconstricción renal en la HTSS.

Debido a que existen receptores AT1 de Ang II tanto en las arteriolas aferentes y eferentes (72-74), la vasodilatación renal observada posterior a la administración de candesartan en el grupo con HTSS, sugiere un aumento de los receptores AT1 en la vasculatura glomerular, o bien a concentraciones de Ang II intrarrenales anormalmente altas (48,75,76).

De acuerdo con esto, Lombardi y cols. (48) demostraron que las lesiones vasculares observadas en este modelo son dependientes del receptor AT1 de Ang II. En efecto, se ha demostrado que después de la infusión de Ang II el número de receptores AT1 disminuye en el intersticio pero no en el glomérulo, además existe un aumento de la enzima convertidora de Angiotensina ECA en el borde en cepillo de las células del túbulo proximal como en los sitios de lesión intersticial (18). La Ang II intrarrenal es regulada por varios procesos complejos que involucran la formación y liberación intrarrenal del sustrato, así como su internalización mediada por el receptor AT1 (49). Además, también existe compartimentalización de la Ang II intrarrenal, es decir, los niveles que existen tanto en el líquido del túbulo proximal como en el líquido intersticial son mucho mayores que en la circulación sistémica (77). Esta elevación intrarrenal de Ang II ocurre en forma independiente del SRA sistémico (78).

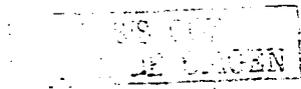
Los estudios de HTA inducida por Ang II demuestran que el aumento en los niveles de Ang II intrarrenal son debidos en parte a recaptura de la Ang II circulante vía su receptor AT1 (75, 79,80) y a la producción endógena de Ang II (81). Parte de esta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ang II internalizada se acumula en los endosomas y por lo tanto se encuentra potencialmente disponible para producir efectos dentro de la célula (82). El aumento de la Ang II intrarrenal ejerce una retroalimentación positiva para aumentar los niveles de Angiotensinógeno, lo cual contribuye a un mayor incremento de la Ang II en estados hipertensivos (49).

En contraste con el grupo de infusión de Ang II, en los animales que recibieron mofetil micofenolato se previno el desarrollo de HTSS. En este grupo los animales tuvieron una presión arterial más elevada, (en el límite de hipertensión 135-140 mmHg) que el grupo control, sin embargo, presentaron una elevación de las resistencias de las arteriolas aferente y eferente a diferencia del grupo que solamente recibió dieta alta en sal, no mostrando diferencias en el resto de los parámetros hemodinámicos. Con la administración de candesartan la disminución en la presión arterial fue de menor magnitud que en el grupo con HTSS, y el comportamiento de la hemodinámica glomerular en el grupo con MMF fue similar a las ratas control.

Recientemente se ha enfatizado la contribución de la lesión microvascular y tubulointersticial para explicar la génesis de la HTA (85). En modelos de HTSS desarrollados con disminución de la síntesis de óxido nítrico, cargas proteicas, infusión de norepinefrina, e incluso en ratas espontáneamente hipertensas se ha observado un incremento de la infiltración inflamatoria y lesión tubulointersticial. El mecanismo de daño renal varía en los modelos antes descritos, pero en la mayoría de ellos se asocian con vasoconstricción e isquemia. La reactividad vascular con cambios súbitos en la presión arterial son transmitidos a la microcirculación renal debido a una respuesta autorregulatoria inadecuada, lo que produce lesión capilar y daño



tubulointerstial. En estos modelos de HTA la administración de MMF produce disminución de células inflamatorias productoras de Ang II y se evita el desarrollo de la HTSS (86). Rodríguez-Iturbe y cols. (96) demostraron en ratas espontáneamente hipertensas que existía infiltración inflamatoria cuando desarrollaban la HTA, al administrar MMF la presión arterial disminuía a niveles normales con una reducción de las células inflamatorias infiltrantes, (linfocitos y macrófagos) que fueron positivas para Angiotensina II, sin embargo en ninguno de estos estudio se evaluó la contribución de la Ang II en la hemodinámica glomerular producida por el proceso inflamatorio en el desarrollo de la HTSS. En estos estudios el inmunosupresor evito el desarrollo de la sensibilidad a sal, lo que indica que las células inflamatorias tienen un papel fundamental en el desarrollo de HTA en este modelo. Estos hallazgos sugieren que la disminución de la infiltración inflamatoria disminuye la concentración de Ang II intrarrenal.

En nuestro estudio el comportamiento de la hemodinámica glomerular al bloquear los receptores AT1 de Ang II en el grupo con MMF, demuestra claramente que la infiltración inflamatoria de células productoras de Ang II contribuyen en la producción endógena y un acúmulo tardío de Ang II intrarrenal, lo que perpetúa la vasoconstricción cortical y el desarrollo de la sensibilidad a sal.

Por otra parte, las células inflamatorias expresan todos los componentes del sistema renina-Angiotensina (87). Una de las respuestas tempranas a la inflamación es una sobrerregulación de los niveles de Angiotensinógeno (92). Durante la diferenciación de monocitos a macrófagos existe activación del SRA (93), además de presentar en los sitios de inflamación una alta actividad de la enzima convertidora de Angiotensina

(94). Estos mecanismos indican que la Ang II recluta y activa a las células inflamatorias, con lo que pueden asimismo aumentar la activación del SRA local y aumentar la generación de Angiotensina II. Este incremento local de Ang II puede inducir estrés oxidativo local y por lo tanto contribuir a la progresión y perpetuación de la lesión inflamatoria además del daño renal. Por otra parte, la Ang II proveniente del mismo proceso inflamatorio actúa como autacóide sobre las células inflamatorias a través de su receptor AT1, lo que induce una mayor proliferación de linfocitos mediado por la activación de la fosfatasa de calcineurina (88), sobreexpone las moléculas de adhesión intercelular y vascular (ICAM-1 y VCAM-1), así como la P-selectina (89-91); al mismo tiempo activa a los monocitos mediante la proteína quimioattractante de monocitos 1 MCP-1 (92), así como a otras interleucinas e interferón alfa y gama.

Por las evidencias previamente mencionadas, la Ang II es considerada actualmente un factor de crecimiento y/o citocina capaz de inducir la producción de superóxido mediante la activación de oxidasas de NADH/NADPH en la membrana celular (63), así como radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, lo que resulta en producción de F₂α isoprostanos que se caracterizan por un fuerte efecto vasoconstrictor y antinatriurético (64). Además, se ha reportado que la secreción de endotelina 1 en cultivo de células mesangiales es estimulada por la Ang II o por un mecanismo que involucra a la PKC (65). Además, en otros modelos de HTSS se ha observado un incremento en la liberación de radicales libres de oxígeno producido por la dieta alta en sal, indicando que la DAS incrementa el estrés oxidativo y así contribuir en la génesis de la HTSS (83). Este aumento en el estrés oxidativo produce una variedad de efectos negativos en la función celular, incluyendo alteraciones en los factores de

transcripción, kinasas y la síntesis proteica, que pueden inducir hipertrofia, migración, proliferación, disfunción endotelial e inflamación (84). Nuestro estudio demuestra claramente el efecto benéfico del antagonismo de los receptores AT1 de Ang II en la hipertensión sensible a sal. Así la Ang II tiene múltiples vías por las cuales puede inducir la síntesis de mediadores vasoactivos que pueden influir en la hemodinámica renal y la excreción de sodio.

A este respecto, existen evidencias de un efecto antioxidante del candesartan (66, 67), sin embargo hay que tener en cuenta que nosotros utilizamos un bolo de manera aguda y el efecto antioxidante ha sido reportado después de 2 semanas de su administración (67).

Los cambios hemodinámicos inducidos por el candesartan en el grupo control, puede ser atribuida a una respuesta autorregulatoria renal inapropiada; a pesar de que la presión arterial se mantuvo siempre dentro de autorregulación, no se observaron cambios en las resistencias de las arteriola aferente y eferente. Estos resultados difieren con los reportados por otros autores (59), en la cual la autorregulación no es afectada por el candesartan en ratas normales; sin embargo, nuestro grupo control fue expuesto a una dieta alta en sal durante 5 semanas. La dieta alta en sal administrada por largo tiempo produce adaptaciones crónicas del sistema de retroalimentación tubuloglomerular, principalmente debidos a una disminución de los niveles de Angiotensina II resultando en una secreción de renina alterada (60). En efecto, Ingerl demostró claramente que en ratas normales expuestas a dieta alta en sal, la actividad de renina disminuye significativamente así como la concentración de Angiotensina I y II en la corteza y medula renal (61), por

lo que la disminución de la actividad del sistema renina Angiotensina podría resultar en una sensibilidad mas baja del sistema de retroalimentación tubuloglomerular y por lo tanto, una autorregulación deficiente. Con respecto a este punto, se ha reportado que el candesartan restaura la autorregulación renal en ratas hipertensas (59,62), pero ante la baja actividad del sistema renina Angiotensina es esperada una respuesta menor al bloqueo del receptor AT1, como se demostró en nuestro grupo control. Por otra parte, Navar y cols. han demostrado que la disminución substancial en la presión arterial estimula una respuesta adrenérgica que puede explicar la vasoconstricción cortical observada en su estudio (58). En nuestras ratas la disminución de la presión arterial fue moderada, sin embargo nosotros utilizamos 0.25 mg/kg de candesartan, la cual es considerada una dosis alta; por lo que no podemos descartar el decremento de la hemodinámica glomerular a una respuesta adrenérgica en el grupo control y Ang II + MMF; por otra parte, en estos grupos la diferencia entre los valores de la filtración glomerular total y la disminución de la FGN posterior a la administración de candesartan puede explicarse por una redistribución del flujo hacia las nefronas yuxtamedulares, con lo cual se puede compensar la disminución de la filtración en las nefronas corticales.

Este trabajo apoya la hipótesis que las elevaciones de la presión arterial producen isquemia renal con lesión microvascular y tubulointerstitial con infiltración inflamatoria y expresión de Ang II en los sitios de lesión y por las células infiltrantes (células T y macrófagos) (22,36), que favorecen la producción local de factores vasoactivos principalmente Ang II intrarrenal, lo que produce un desequilibrio de factores vasoconstrictores y vasodilatadores que favorece la retención de sodio (55).

CONCLUSIÓN.

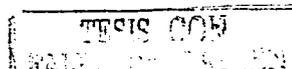
El bloqueo de los receptores AT1 de Ang II produce vasodilatación renal en la fase de sensibilidad a sal en este modelo, sugiriendo que la Angiotensina II es el mediador de la vasoconstricción cortical asociada al desarrollo de la hipertensión arterial sensible a sal. El comportamiento de la hemodinámica glomerular con la disminución de la infiltración inflamatoria con MMF y el bloqueo del receptor AT1 con candesartan, sugiere que las células inflamatorias tubulointersticiales realizan una producción endógena y un acúmulo tardío de Ang II intrarrenal, que contribuye al mantenimiento de los cambios hemodinámicos glomerulares (vasoconstricción cortical) y al desarrollo de HTSS. El uso de candesartan disminuye la vasoconstricción renal mejorando así la presión arterial y posiblemente el mecanismo de natriuresis. Sin embargo, si el efecto de candesartan sobre la hemodinámica renal fue solamente por el bloqueo del receptor AT1 de Ang II o por cambios en la síntesis de otros mediadores vasoactivos inducidos por la Ang II son motivo para realizar investigaciones posteriores, lo cual queda fuera de los objetivos de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood, and National High Blood Pressure Educational Program, The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood pressure. *NIH publication No 97-4080*, 1997.
- 2.- Encuesta Nacional De Enfermedades Crónicas. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de la Nutrición SZ, 1993.
- 3.- Guidelines Subcommittees. 1999 World Health Organization, International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hipertens* 17: 151-183, 1999.
- 4.- Elliott P, Stamler J, Nichols R, Dyer AR. Intersalt analysis of 24 hours sodium excretion and blood pressure within and across populations. *BMJ* 312:1249-1256, 1996.
- 5.- Herrera-Acosta J. Hipertension arterial dependiente de sal. *Arch Cardiol Mex* 71:576-580, 2001.
- 6.- Guyton C. A. Blood pressure control- Special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816, 1991.
- 7.- Guyton C. A. Kidneys and Fluids in Pressure Regulation, Small Volume but large pressure changes. *Hypertension* 19: S12-8, 1992
- 8.- Cowley AW, Mattson DL, Roman RJ. The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 25: 663-673, 1995
- 9.- Granger P, J. Pressure Natriuresis. Role of renal Interstitial hydrostatic pressure. *Hypertension* 19: S1 9-17, 1992
- 10.- Johnson RJ, Schreiner G. Hypothesis: The role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Kidney Int* 52:1169-1179, 1997.
- 11.- Wilson C, Byom FB. The vicious circle in chronic Bright's Disease: Experimental evidence from the hypertensive rat. *Q. J. Med* 10:65-96, 1940.
- 12.- Kolesky S, Rivera-Velez JM, Pritchard WH. Production of Hypertension and vascular disease by Angtensin. *Arch Pathol* 82:99-106, 1966.
- 13.- Yen Trun A, Vari RC, El-Dhar SS, Navar LG. Augmentation of intrarenal Angtensin II levels by chronic Angtensin II infusion. *Am J Physiol* 266: F120-F128, 1994.
- 14.- Eng E, Veniant M, Floege J, Fingerle J, Alpers CE, Menhard J, Clozel JP, Johnson RJ. Renal proliferation and phenotypic changes in rats with two kidney one clip Goldblatt hypertension. *Am J Hypertens* 7:177-185, 1994.
- 15.- Mai M, Geiger H, Higers EF, Veelken R, Mann JFE, Dammrich J, Luft FC. Early interstitial changes in hypertension induced renal injury. *Hypertension* 22: 754-765, 1992.
- 16.- Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritz P, Floege J, Shwartz SM. Renal injury from Angtensin II mediate hypertension. *Hypertension* 19: 464-474, 1992.

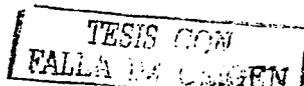
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 17.- Navar LG, Harrison-Bernard L, Imig J, Cervenka L, Mitchell K. Intrarenal Angtensin II generation and renal effects of AT₁ Receptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 10:4:S266-272, 1999.
- 18.- Navar LG, Harrison-Bernard L, Imig J, Cervenka L, Mitchell K. Renal responses to AT₁ receptor blockade. *Am J Hypertens* 13:45S-54S, 2000.
- 19.- Matsubara H. Physiological role of Angtensin II type 2 receptors in cardiovascular and renal disease. *Circ Res* 83:1182-1191, 1998.
- 20.- Lombardi D, Gordon K, Polinsky P, Suga SH, Schwartz SM, Johnson RJ. The development of salt hypertensive hypertension after short-term exposure to Angtensin II. *Hypertension* 33:1013-1019, 1999.
- 21.- Johnson RJ, Gordon K, Suga SH, Duijvestijn AM, Griffin K, Bidani A. Renal injury and salt-sensitive hypertension after exposure to catecholamines. *Hypertension* 34:151-159, 1999.
- 22.- Quiroz Y, Pons H, Gordon K, Rincon J, Chavez, Parra G, Herrera-Acosta J, Egido J, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F38-F47, 2001.
- 23.- Alvarez V, Quiroz Y, Pons H, Rodriguez-Iturbe B. Protein overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension that can be prevented with suppression of the protein-induced infiltration of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 12:A2376, 2001.
- 24.- Zou LX, Hymel A, Imin JD, Navar LG. Renal accumulation of circulating Angtensin II in Angtensin infuse rats. *Hypertension* 27:658-662, 1997.
- 25.- Franco M, Tapia E, Santamaria J, Zafra I, Rodriguez-Iturbe B, Gordon F, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt-sensitive hypertension developed after Ang II exposure. *J Am Soc Nephrol* 12:2263-2271, 2001.
- 26.- Schultz PJ, Tolins JP. Adaptations to increase dietary intake in the rat. *J Clin Invest* 91:642-650, 1993.
- 27.- Ichikawa I, Harris RC. Angtensin actions in the kidney: Renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 40:583-596, 1991.
- 28.- Fogo A, Ichikawa I. Evidence for central role of growth promoters in the development of sclerosis. *Sem Nephrol* 9: 329-342, 1989.
- 29.- Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. The role of immunocompetent cells in non-immune renal diseases. *Kidney Int* 59:1626-1640, 2001.
- 30.- Wu LL, Yang N, Roscoe CJ, Cooper ME, Gilbert CR, Atkins RC, Lan HY. Macrophage and myofibroblast proliferation in remnant kidney. Role of Angtensin II. *Kidney Int* 52: S221-S225, 1997.
- 31.- Sciller B, Moran J. Focal glomerulosclerosis in remnant kidney model: an inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 12:430-437, 1997.
- 32.- Romero F, Rodriguez-Iturbe B, Parra G, González S, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int* 55:945-955, 1999.



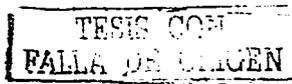
- 33.- Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil a rationally designed immunosuppressive drug. *Clin Transplant* 7:96-112,1993.
- 34.- Sing LL, Halloran PF. Mycophenolate mofetil in kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol& Hypertens* 5: 508-513,1996.
- 35.- Heemann U, Azuma H, Hamar P, Schmid C, Tilney N, Philipp T. Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and up regulation of adhesion molecules in acute rejection of rats allografts. *Transplant Immunol* 4:69-79,1996.
- 36.- Rodriguez-Iturbe B, Pons GH, Quiroz Y, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gomez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ. Mycophenolate mofetil prevents salt sensitive hypertension resulting from Angtensin II exposure. *Kidney Int* 59:2222-2232, 2001.
- 37.- Mimram A, Ribstein J. Angtensin Receptor Blockers: pharmacology and clinical significance. *J Am Soc Nephrol* 10:4:S273-277, 1999.
- 38.- Weinberger M, Fineber N, Fineber E, Weinberger M. Salt sensitivity, pulse pressure and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension* 37: 429-432,2001.
- 39.- Davidson WD, Sackner MA. Simplification of the anthrone method for determination of inulin clearance studies. *J Lab Clin Med* 62:351-356, 1963.
- 40.- Vureck GG, Pegram SE. Fluorometric method for determination of nanogram quantities of inulin. *Anal Biochem* 16:409-419,1966.
- 41.- Viets JW, Deen WM, Troy J, Brenner BM. Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or ophthalaldehyde. *Anal Biochem* 88:513-521, 1978.
- 42.- Henry RJ, Sobel C, Segalove M. Turbidimetric determination of protein with sulfosalicylic acid and trichloroacetic acid. *Proc Soc Exp Biol & Med*. 92:748-751, 1956.
- 43.- Baylis C, Deen WM, Myers D, Brenner BM. Effects of some vasodilator drugs on transcapillary fluid exchange in renal cortex. *Am J Physiol* 230:1148-1158, 1976.
- 44.- Campese C, Bianchi S, Bigazzi R. Is microalbuminuria a predictor of cardiovascular and renal disease in patient with hypertension. *Curr Op Neph Hypert* 9: 143-148, 2000.
- 45.- van Paesssen P, Zeeuw D, Navis G, Jong PE. Does the renin-Angtensin System determine the renal and systemic hemodynamic response to sodium in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1976;27:202-208.
- 46.- Romero JC, Buntly MD, Vanhoutte PM, Knox FG. Intrarenal mechanisms that regulate sodium excretion in relationship to change in blood pressure. *Mayo Clin Proc* 64:1405-1424, 1989.
- 47.- Bauer JH, Brooks CS, Burchs RT. Renal Function and hemodynamic studies in low renin normal-renin essential hypertension. *Arch Intern Med* 142:1317-1323, 1982.
- 48.- Lornbardi D, Viswanathan M, Vio C, Saavedra J, Schwartz S, Johnson RJ. Renal and Vascular injury induced by exogenous Angtensin II is AT1 receptor-dependent. *Nephron* 37: 66-74, 2001.

- 49.- Navar LG, Harrison-Bernard L, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal Angtensin II in Hypertension. *Hypertension* 39 part 2: 316-322, 2002.
- 50.- Norrelund H, Christensen K, Samani N, Kimber P, Mulvany M, Korsgaard N. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension* 24: 301-308, 1994.
- 51.- Gomez-Alamillo C, Sanchez-Casajús A, Sierra M, Huarte E, Diez J. Vasoconstriction of afferent arteriole and defective renal synthesis of nitric oxide in essential hypertension. *Kidney Int* 49 S55:129-131, 1996.
- 52.- Chiolero A, Würzner G, Burnier M. Renal Determinants of the salt sensitivity of blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 16:452-458, 2001.
- 53.- Chiolero A, Maillard M, Nussberger J, Brunner H, Burnier M. Proximal sodium reabsorption: an independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension* 36:631-637, 2000.
- 54.- Converse RL, Jacobsen TN, Tolo RD, et al. Sympathetic overactivity in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med* 327:1912-1218, 1992.
- 55.- Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner G, Rodriguez-Iturbe B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med* 346:913-923, 2002.
- 56.- Rosner B. Fundamentals of biostatistics. Duxbury press. P 263, 1995.
- 57.- Quiroz Y, Pons H, Gordon JL, Rincon 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* 281:F38-F47, 2001.
- 58.- Cervenka L, Wang C-T, Navar LG. Effects of acute AT1 receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in the rats. *Am J Physiol* 274:F940-F945, 1998.
- 59.- Incho EW, Imig JD, Deichmann PC, Cook AK. Candesartan cilxetil protects against loss of autoregulatory efficiency in Angtensin II-infused rats. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11:S178-83, 1999.
- 60.- Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* 274:R263-R279, 1998.
- 61.- Ingerit C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Effects of dietary salt changes on renal renin-Angtensin system in rats. *Am J Physiol* 283:F995-F1002, 2002.
- 62.- Wang C-T, Chin Sy, Navar LG. Impairment of pressure natriuresis and renal autoregulation in Ang II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol* 279:F319-F325, 2000.
- 63.- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harison DG. Angtensin II-mediated hypertension in rat increases vascular superoxide production via membrane NADP/NADHP oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97:1916-1923, 1996.
- 64.- Romero JC, Reckelhoff JF. Oxidative stress may explain how hypertension is maintained by normal levels of Angtensin II. *Braz J Med Biol Res* 33:653-660, 2000.



- 65.- Kohno M, Horio T, Ikeda M, Yokokawa Koji, Fukui T, Yasunary K, Kurihara N, Ikeda T. Angtensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured mesangial cells. *Kidney Int* 42:860-866. 1992.
- 66.- Sugimoto K, Tsuruoka S, Matsushita K, Fujimura A. Effects on candesartan cilexetil on oxidative state and renal function in 5/6 nephrectomized rats. *J Hum Hypertens* 13 suppl 1:S63-70. 1999.
- 67.- Welch WJ, Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *KidneyInt* 59:1257-1263. 2001.
- 68.- Ruari X, Wagner C, Chatziantoniou C, Kurtz A, Arendshorst W. Regulation of Angtensin II Receptor AT1 subtypes in Renal Afferent Arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* 99:1072-1081. 1997.
- 69.- Wang H, Garvin JL, Carretero OA. Angtensin II enhances tubuloglomerular feedback via luminal AT1 receptor on the macula densa. *KidneyInt* 60:1851-1857. 2001.
- 70.- Brannstrom K, Morsing P, Arendshort WJ. Candesartan normalizes exaggerated tubuloglomerular feedback activity in young spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 10: S11: S213-9. 1999.
- 71.- Braam B, Mitchell KD, Koomans HA, Navar LG. Relevance of the tubuloglomerular feedback mechanism in pathophysiology. *J Am Soc Nephrol* 4:1257-1274. 1993.
- 72.- Denton KM, Fennessy PA, Alcorn D, Anderson WP. Morphometric analysis of the actions of Angiotensina II on arterioles and glomeruli. *Am J Physiol* 262:F367. 1992.
- 73.- Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein EE. Immunohistochemical localization of rat Angtensin II AT1 receptor. *Am J Physiol* 264: F989-F995. 1993.
- 74.- Harrison-Bernard L, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, El-Dahr SS. Immunohistochemical localization of Ang II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 273: F170-F177. 1997.
- 75.- Zou L, Imig JD, Von Thun AM, Hymel A, Ono H, Navar LG. Receptor-mediated intrarenal Ang II augmentation in Ang II-infused rats. *Hypertension* 28: 669-677. 1996.
- 76.- Harrison-Bernard LM, El-Dhar SS, O'Lean DF, Navar LG. Regulation of Angtensin II type 1 receptor mRNA and protein in Angtensin II induced hypertension. *Hypertension* 33: 340-346. 1999.
- 77.- Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Renal interstitial fluid concentrations of Angtensin I and II in anesthetized rats. *Hypertension* 39: 129-134. 2002.
- 78.- Navar LG, Harrison-Bernard LM. Intrarenal Angtensin II augmentation in Angiotensina II dependent hypertension. *Hypertension Res* 23:291-301. 2000.
- 79.- Zou L, Hymel A, Imig JD, Navar LG. Renal accumulation of circulating Angtensin II in Angiotensina II infused rats. *Hypertension* 27: 658-662.

- 80.- Zou L, Iming JD, Hymel A, Navar LG. Renal uptake of circulating Angtensin II in Val-Angtensin II infused rats is mediated by AT1 receptor. *Am J Hypertens* 11:570-578, 1998.
- 81.- Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Enhancement of Angtensinogen expression in Angtensin II dependent hypertension. *Hypertension* 37: 1329-1335, 2001.
- 82.- Imig JD, Navar LG, Zou LX, O'Reilly KC, Allen PL, Kaysen JH, Hammond TG. Renal endosomes contain Angtensin peptides, converting enzyme, and AT1 receptors. *Am J Physiol* 277: F303-F311, 1999.
- 83.- Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning RD. Oxidative stress in Dhal Salt-Sensitive hypertension. *Hypertension* 4:1346-1352, 2003.
- 84.- Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in Angtensin-induce hypertension. *Am J Physiol* 284:R893-R912, 2003.
- 85.- Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B, Schreiner GF, Herrera-Acosta J. Hypertension: a microvascular and tubulointerstitial disease. *J Hypertens* 20: S1-S7, 2002.
- 86.- Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Herrera-Acosta J, Jonson RJ, Pons HA. The role of immune cells infiltrating the kidney in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. *J Hypertens* 20: S9-S14, 2002.
- 87.- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of Angtensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:321-329, 2001.
- 88.- Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB. Angtensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest* 104:1693-1701, 1999.
- 89.- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S. Angtensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells an increase soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 100:1646-1652, 1999.
- 90.- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, et al. Angtensin II induce vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature. *Circulation* 100: 1223-1229, 1999.
- 91.- Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, et al. Angtensin II induce leukocyte-endothelial cell interaction in vivo via AT1 and AT2 receptor-mediated P-selectin unregulation. *Circulation* 24:102:2118-23, 2000.
- 92.- Ruiz-Ortega M, Bustos C, Ortega M, et al. Angtensin II participates in mononuclear cell recruitment in the kidney through nuclear facto-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 gene expression. *J Immunol* 161: 430-439, 1998.
- 93.- Brasier AR, Li J. Mechanism for inducible control of Angtensinogen gene transcription. *Hypertension* 27: 465-475, 1996.
- 94.- Okamura A, Rakugi H, Ohishi M et al. Upregulation of renin-Angtensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 17: 537-545,1999.
- 95.- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, et al. Increase accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94: 2756-2767, 1996.



96.- Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, et al. Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 282: F191-F201, 2002.

97.-Shao J, Nangaku M, Miyata T, Reiko I, Yamada K, Kurokawa K, Fujita T. Imbalance of T-Cell subsets in Angtensin II-infused Hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension* 42:31-38, 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN