



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO
CHAVEZ"

**"Angiotensina II intrarrenal como factor de inflamación
intersticial y vasoconstricción cortical renal en un modelo
experimental de hipertensión sensible a sal"**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN:

NEFROLOGIA

PRESENTA:

DR. JOSE DE JESUS VERGARA SANCHEZ



TUTOR DE TESIS
DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA

MEXICO D.F.

SEPTIEMBRE 2006



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
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Dra. Martha Franco Guevara

Jefe del Departamento de Nefrología
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Dr. José de Jesús Vergara Sánchez

Residente de Tercer Año del Departamento de Nefrología
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

- *A mi esposa, Marisol, gracias por ser la luz de mi entendimiento, mi razón y mi esperanza.*
- *A mis padres, Jesús y Alma, y a mi hermana, Belén, por su amor incondicional.*
- *A mis amigos Hynuk y Ernesto, gracias por ser mis hermanos.*
- *A mis Maestros, Dr. Rubén Tamayo Pérez, Dr. Héctor García Alcalá y Dr. Guillermo Flores Padilla, por guiarme y ser fuente de inspiración.*
- *A la Dra. Martha Franco Guevara, al Dr. Héctor Pérez-Grovas Garza, al Dr. Francisco Rodríguez Castellanos y al Dr. Eduardo Mancilla Urrea, por su confianza, afecto y dedicación para mi aprendizaje y crecimiento médico y personal.*
- *Al Dr. Jaime Herrera Acosta †, por sembrar en nosotros su amor a la Nefrología y compartirnos su amor a la vida.*
- *A ti Sonia, por compartirme tu alegría de vivir, te extrañamos mucho.*
- *Al Gran Arquitecto*



INDICE GENERAL

Contenido	Página
Resumen	5
Introducción	6
Pregunta de investigación	21
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	24
Material y métodos	25
Análisis estadístico	35
Resultados	36
Discusión	43
Conclusión	47
Referencias	48

“Angiotensina II intrarrenal como factor de inflamación intersticial y vasoconstricción cortical renal en un modelo experimental de hipertensión sensible a sal”

José de Jesús Vergara Sánchez ¹, Martha Franco Guevara ².

¹ Residente de Tercer Año de Nefrología, ² Jefe del Departamento de Nefrología Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Antecedentes: La hipertensión sensible a sal se presenta en el 50% de los pacientes menores de 30 años y en el 80% de sujetos mayores de 50 años con hipertensión esencial. El mecanismo responsable del desarrollo de la sensibilidad a sal no se ha establecido con precisión.

Objetivo: Evaluar el papel de AngII en las alteraciones hemodinámicas glomerulares en la hipertensión sensible a sal mediante el bloqueo agudo de los receptores AT1 de Ang II con candesartán, después de 5 semanas de dieta alta en sal y determinar el papel de la infiltración inflamatoria túbulointersticial en la vasoconstricción cortical y producción de AngII intrarrenal, al administrar micofenolato de mofetilo .

Material y métodos: Se utilizaron 4 grupos de ratas Sprague Dawley macho: 1. AngII (n=10), 2. AngII+candesartán (n=9). 3. AngII+micofenolato (n=9) y 4. Sham control (n=10) a las que se les administró angiotensina II durante 2 semanas por vía subcutánea mediante una bomba miniosmótica en el dorso del animal a los grupos experimentales. El día 14 la minibomba fue retirada y se permitió la recuperación de las ratas por 5 días con dieta normal en sal (0.4% NaCl). Posteriormente, se les administró dieta alta en sal (4% NaCl) por 5 semanas al final de los cuales llevaron a cabo los estudios de micropunción y microdiálisis para determinar la concentración de AngII renal. Se realizó medición de la presión arterial sistólica en periodo basal, cada semana durante las dos primeras semanas y cada dos semanas el resto del estudio y estudios de hemodinámica glomerular. En siete ratas de cada grupo, se obtuvieron cortes coronales del riñón izquierdo al momento de sacrificarlas, determinándose la infiltración de macrófagos y linfocitos.

Resultados: Las ratas a las que se les infundió AngII desarrollaron hipertensión sistólica, disminuyendo al suspender la infusión; al alimentarles con dieta alta en sal desarrollaron nuevamente hipertensión. Las ratas que recibieron MMF durante la infusión de AngII, desarrollaron hipertensión durante la infusión de angiotensina, y se mantuvieron con hipertensión limítrofe durante la dieta alta en sal . Las ratas Sham no desarrollaron hipertensión durante la administración de la dieta alta en sal. También se demostró aumento en la infiltración intersticial de células inflamatorias en el grupo de AngII, así como disminución en éstas en las ratas a las cuales se les administró MMF; el candesartán no modificó la infiltración celular.

Conclusiones: Demostramos que los niveles de AngII intrarrenal se encuentran elevados en este modelo y que existe correlación con la presencia de inflamación intrarrenal, misma que puede ser evitada por el MMF, con lo que disminuyen los valores de angiotensina intrarrenal, así como la vasoconstricción renal puede ser revertida por un bloqueador de los receptores AT1 de angiotensina.

INTRODUCCION

La hipertensión arterial es una enfermedad cuyo impacto médico y en materia de salud pública va en aumento. La prevalencia de hipertensión aumenta con la edad; más de la mitad de las personas de entre 60-69 años y aproximadamente tres cuartas partes de aquellos mayores de 70 presentan presión arterial alta.⁽¹⁾

Se ha reportado que la mortalidad en hombres y mujeres sin hipertensión es de 90% de los 55-65 años hasta los 81-83 años. (Figura 1)

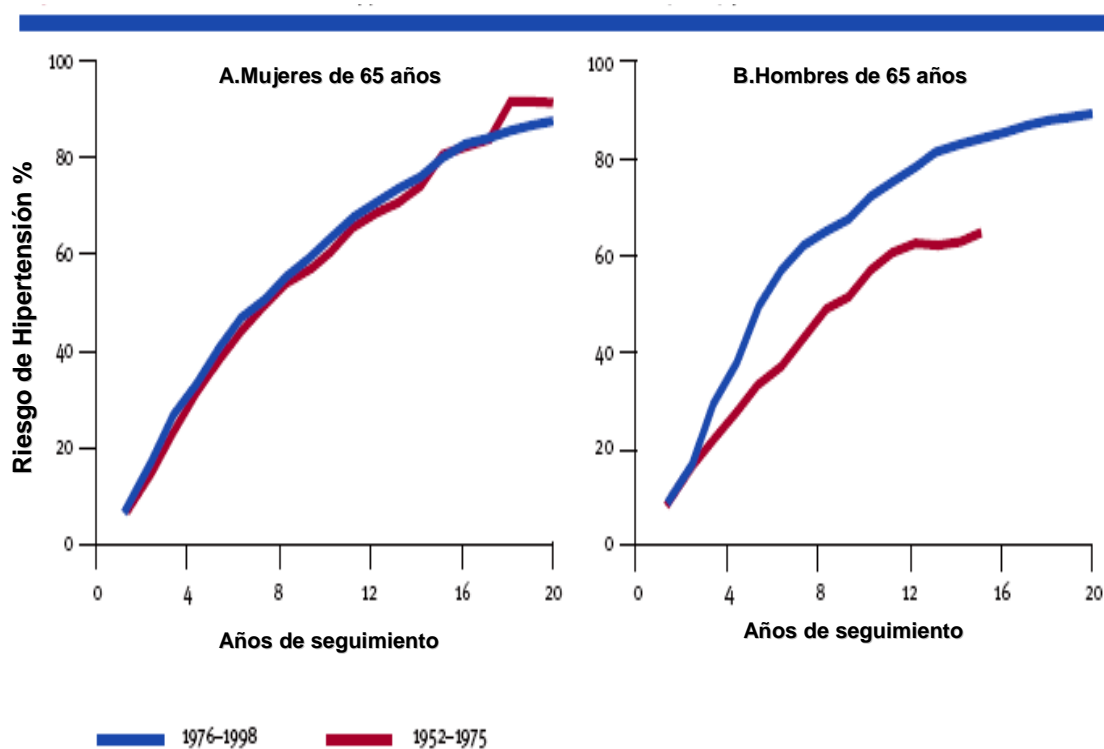


Fig.1 Sobrevida de hipertensión en mujeres y hombres de 65 años.

Datos de estudios observacionales que involucraron a más de 1 millón de pacientes han indicado que la muerte por cardiopatía isquémica (CI) y evento vascular cerebral (EVC) aumenta progresiva y linealmente a partir de cifras de

130/90 mmHg. El mayor riesgo está presente en individuos de los 40 a los 89 años. Por cada 20 mmHg de aumento en la presión sistólica o 10 mmHg en la diastólica, la mortalidad se eleva al doble tanto por CI como por EVC (Figuras 2 y 3).

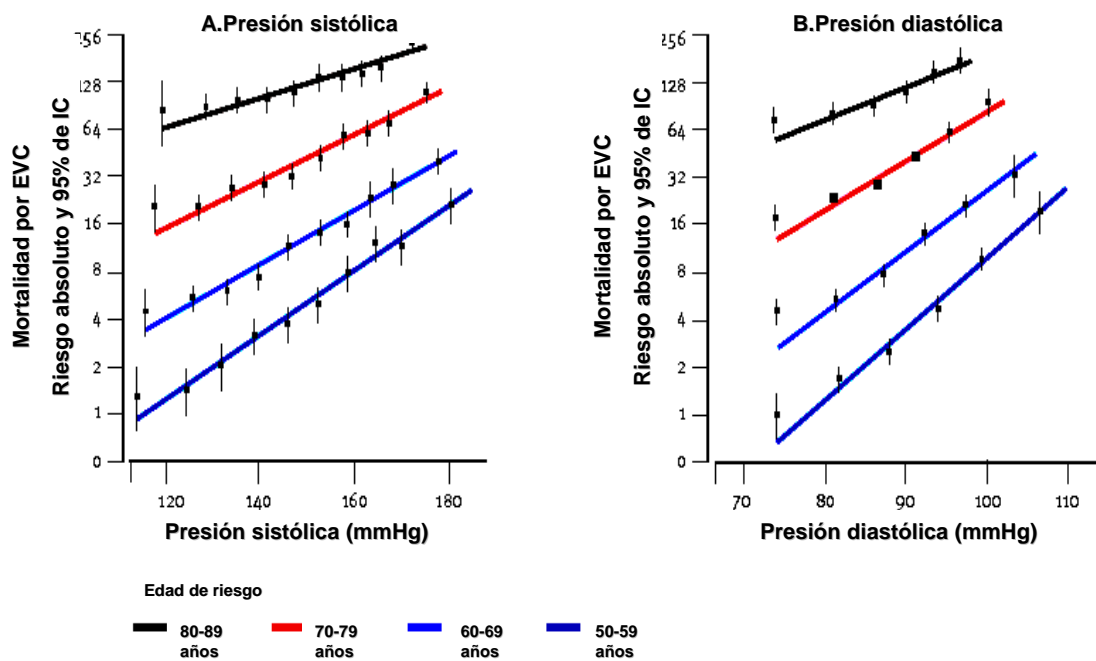


Fig.2 Mortalidad por EVC en cada década de la vida contra presión sanguínea al inicio de cada década.

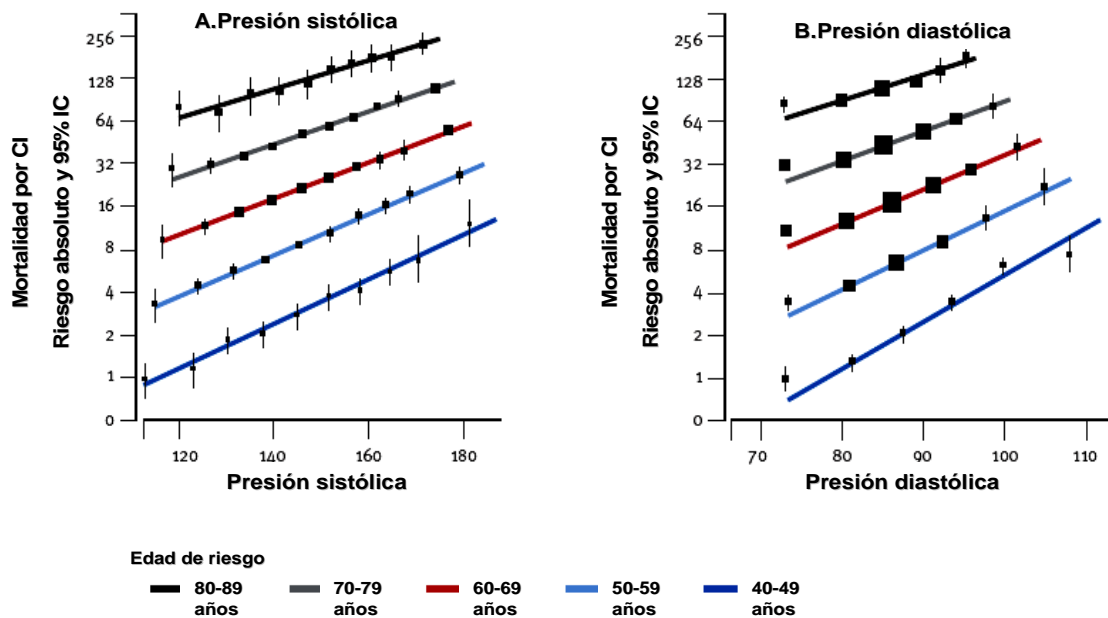


Fig.3 Mortalidad por cardiopatía isquémica (CI) en cada década de la vida contra presión arterial normal al inicio de cada década.

De acuerdo al USRDS (United States Renal data System Annual Report), 2006, la hipertensión es causa de por lo menos la tercera parte de los casos de insuficiencia renal crónica en Estados Unidos⁽²⁾. (Figura 4)

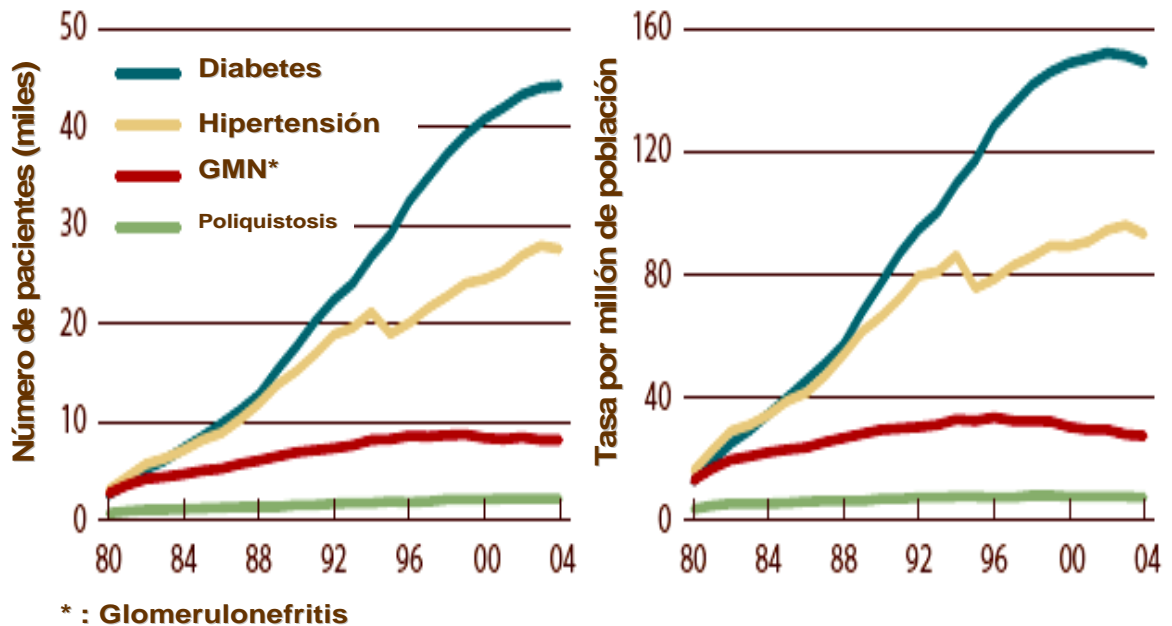


Fig.4 Incidencia e índices ajustados de insuficiencia renal crónica avanzada por diagnóstico primario.

Dada la alta incidencia de hipertensión en la población general y la alta morbi-mortalidad que presenta por las complicaciones como cardiopatía isquémica, EVC e insuficiencia renal, es importante el estudio de su fisiopatología, con el fin de esclarecer los mecanismos por los cuales se desarrolla y establecer puntos específicos para su tratamiento.

En individuos jóvenes menores de 30 años ⁽³⁾ la hipertensión sensible a sal se presenta en el 50% de los pacientes con hipertensión esencial y en sujetos mayores de 50 años, más del 80% tienen hipertensión sensible a sal. Además, con la edad se acentúa la sensibilidad de la presión a la ingestión de sal. Esta característica está presente en cerca de la mitad de los pacientes con hipertensión arterial esencial. Estudios realizados por Weinberger y Cols. demostraron que

sujetos entre 20 y 30 años de edad, el cambio en la ingesta de sal produjo un incremento de 5 mmHg de TAM, en cambio en sujetos mayores de 60 años el aumento observado en la TAM fue superior a 18 mmHg^(4, 44).

Desde el punto de vista clínico, la hipertensión sensible a sal se caracteriza por un mayor riesgo cardiovascular y la frecuencia de eventos coronarios y cerebrovasculares es mayor en estos pacientes. Así mismo, la presencia de nefropatía⁽⁵⁾ y retinopatía es más elevada⁽⁶⁾. La hipertensión arterial sensible a sal (HTSS) se define como el incremento en 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. El mecanismo responsable del desarrollo de la sensibilidad a sal no se ha establecido con precisión, aunque se ha sugerido que pueden estar involucrados factores vasoactivos y natriuréticos como el óxido nítrico, el factor natriurético auricular y el sistema cininas-calikreina⁽⁷⁾.

Independientemente de las alteraciones fisiopatológicas antes descritas, la sensibilidad o dependencia de la presión arterial a la ingesta de sal indica necesariamente una alteración en la relación entre presión arterial y excreción renal de sodio, o “*natriuresis de presión*”. En condiciones normales, un aumento en la presión de perfusión renal se traduce en mayor excreción de sodio y agua lo cual disminuye gradualmente el volumen circulante y eventualmente la presión arterial. Este proceso constituye el sistema de regulación más eficiente de la presión arterial a largo plazo. En hipertensión arterial, la curva de natriuresis de presión está desplazada a la derecha, es decir se requiere una presión arterial más alta para mantener la excreción de sodio normal, lo cual 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 nivel más alto de presión arterial para mantener el balance de sodio (Figura 5).

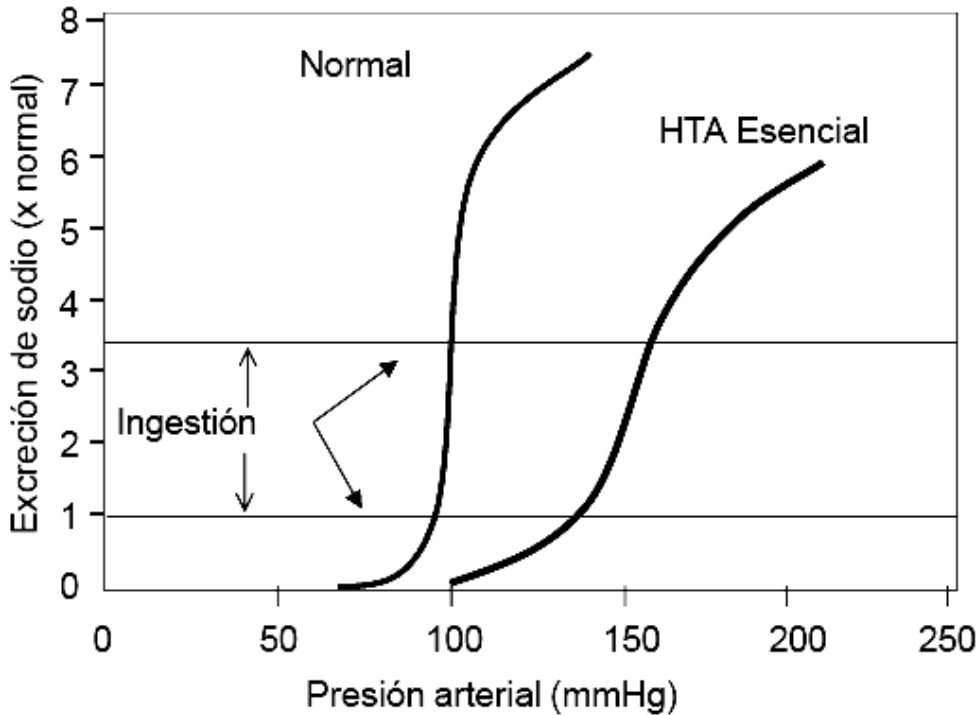


Fig.5. Natriuresis de presión en hipertensión arterial

En condiciones normales, los cambios de presión arterial no alteran la función renal gracias al mecanismo de autorregulación renal que mantiene constantes el flujo y la filtración glomerular. Esto se debe por una parte a la capacidad intrínseca que poseen los vasos preglomerulares de contraerse o dilatarse ante cambios de presión de perfusión para conservar el flujo constante, y por otra, al sistema de autorregulación túbuloglomerular que regula el tono de la arteriola aferente en respuesta al aporte de sodio al túbulo distal (mácula densa). Este mecanismo de autorregulación opera predominantemente en la corteza renal; en la médula renal la capacidad de autorregulación es menos eficiente que en la

corteza, lo cual determina la natriuresis por aumento de presión arterial. A mayor presión de perfusión el flujo sanguíneo a la médula renal aumenta, lo que se traduce en mayor presión y disminución de la osmolaridad en el intersticio lo que limita la salida de sodio y agua de la rama descendente del asa de Henle hacia el intersticio y en consecuencia aumenta el aporte de sodio a la rama ascendente de Henle y a los segmentos tubulares distales y por ende, la excreción urinaria.

(Figura 6)

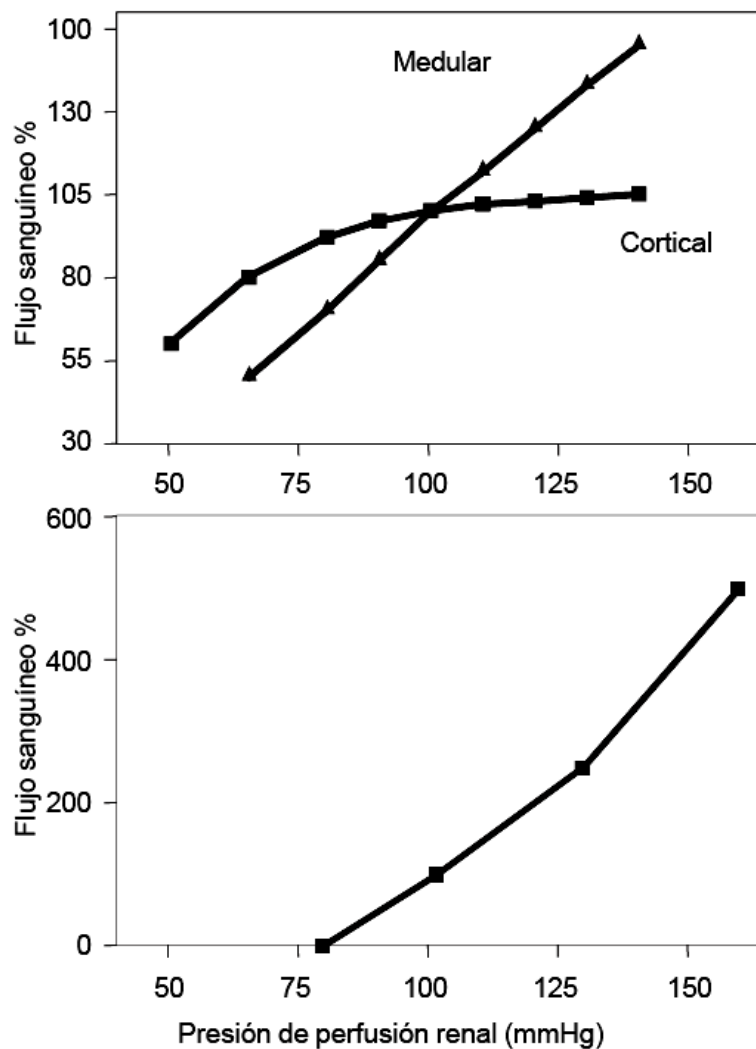


Fig. 6 Relación entre presión de perfusión renal y flujo sanguíneo en corteza y médula renal y excreción renal de sodio.

De acuerdo con lo anterior, la hipertensión sensible a sal implica la existencia de una alteración en el mecanismo de natriuresis de presión, es decir una alteración en la capacidad del riñón para aumentar la excreción de sodio en respuesta a una elevación de presión arterial⁽³⁾.

En estudios experimentales en ratas con hipertensión por estenosis unilateral de arteria renal se ha observado que el riñón contralateral desarrolla alteraciones histológicas caracterizadas por hipertrofia de vasos preglomerulares y lesiones túbulointersticiales focales y mientras más acentuadas son estas lesiones, mayor es la posibilidad de que la hipertensión persista después de liberar la estenosis⁽⁸⁾.

Se ha observado que la infusión crónica de angiotensina II en ratas produce hipertensión grave y cambios histológicos similares a los descritos anteriormente. Después de suspender la infusión, la presión arterial disminuye a cifras cercanas a las normales, sin embargo, la administración de una dieta alta en sal produce una elevación progresiva de la TA, es decir hipertensión sensible a sal⁽⁹⁾.

Estas observaciones sugieren que las alteraciones histológicas juegan un papel fundamental en la generación de hipertensión arterial y en la sensibilidad a sal. Por otra parte, en series grandes de pacientes con hipertensión arterial esencial en los que se estudió la histología renal, los cambios histológicos son muy semejantes a los observados en el riñón contralateral de ratas con hipertensión renovascular⁽¹⁰⁾. El mecanismo por el cual la sensibilidad a sal se establece en el curso de la hipertensión esencial y se acentúa con la edad no se ha establecido con precisión, sin embargo se ha sugerido que ésta puede ser el

resultado de alteraciones estructurales producidas por la hipertensión que eventualmente comprometen la excreción de sodio.

En el curso de la hipertensión esencial la sensibilidad a sal se establece gradualmente como resultado de los cambios estructurales y alteración de mecanismos fisiopatológicos mencionados. En las etapas iniciales existe una hiperactividad adrenérgica. En estos pacientes, la presión arterial tiende a elevarse en forma intermitente, sin embargo a largo plazo desarrollan hipertensión persistente. Johnson y Schreiner sugieren que las elevaciones intermitentes de TA pueden ser el mecanismo inicial de daño renal en esta etapa en que la hipertensión es mediada por catecolaminas, el riñón es normal y el mecanismo de natriuresis de presión se mantiene intacto. Sin embargo, se desarrolla lesión microvascular y túbulointersticial, la hipertensión se hace persistente y se desarrolla la sensibilidad a sal ⁽¹¹⁾. El grupo del Dr. Johnson ha demostrado en varios modelos experimentales la relación entre lesiones túbulointersticiales e hipertensión sensible a sal, tales como en nefropatía por ciclosporina A, el envejecimiento en ratas, en nefropatía hipokalémica y en nefropatía por hiperuricemia.

Con objeto de conocer las alteraciones de la microcirculación glomerular asociadas al desarrollo de hipertensión sensible a sal inducida con infusión crónica de angiotensina II en ratas y su relación con las alteraciones histológicas renales, se han realizado estudios de micropunción renal. La infusión de angiotensina II produce hipertensión arterial marcada y a nivel glomerular vasoconstricción de la arteriola aferente, disminución del flujo y la filtración glomerular, así como del coeficiente de ultrafiltración. El desarrollo de hipertensión sensible a sal después

de suspender la infusión de angiotensina se asocia con persistencia de las alteraciones en la microcirculación renal. Aunque en menor grado, persistió el aumento en la resistencia aferente, la disminución del flujo y la filtración glomerular y del coeficiente de ultrafiltración en nefronas corticales. Desde el punto de vista histológico los cambios más sobresalientes fueron hipertrofia de arteriolas aferentes, ausencia de alteraciones glomerulares, zonas focales de atrofia tubular, rarefacción capilar e infiltrado inflamatorio intersticial compuesto por linfocitos y macrófagos. (Figuras 7 y 8)

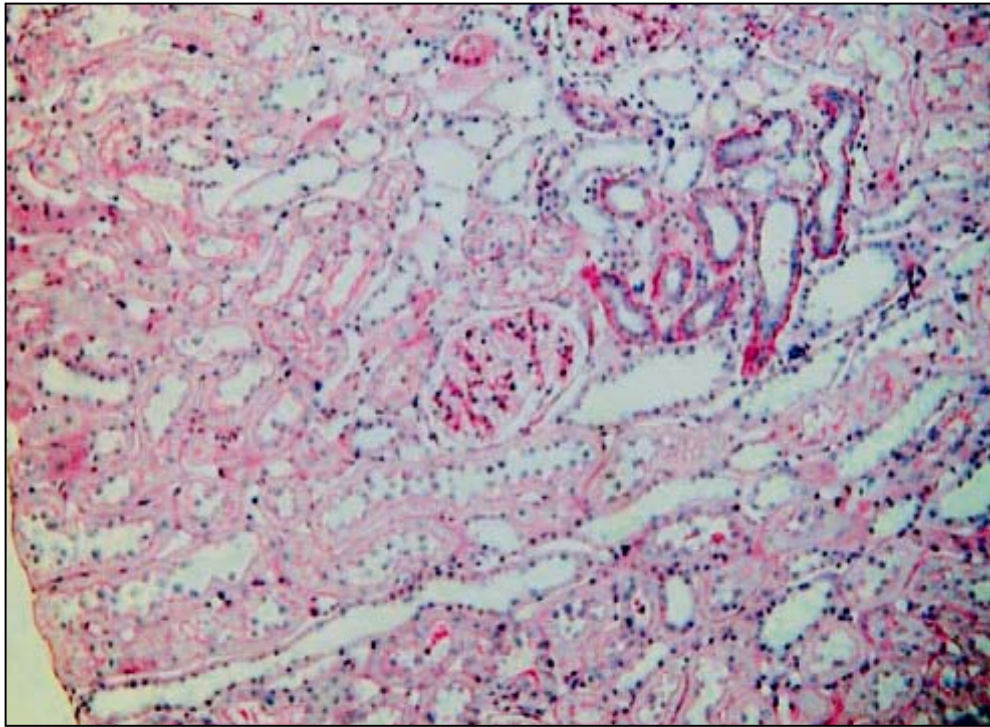


Fig. 7. Infiltrado inflamatorio y daño túbulointersticial

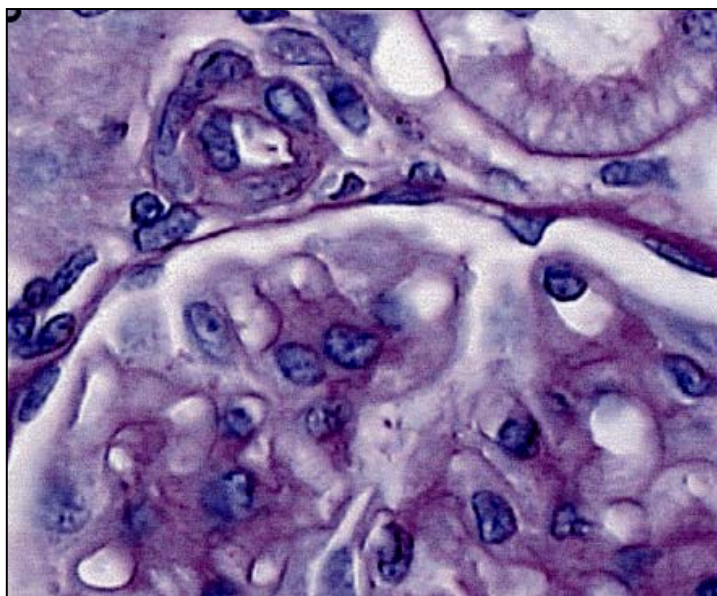


Fig.8 Engrosamiento de arteriola aferente en rata tratada con Ang II

En éste modelo se ha demostrado mediante inmunohistoquímica la presencia de células inflamatorias capaces de producir angiotensina II y radicales libres de oxígeno^(12, 43).

En estudios adicionales se ha evaluado la contribución de las células inflamatorias en la generación de hipertensión sensible a sal y en las alteraciones hemodinámicas glomerulares. Con este objeto se administró a las ratas micofenolato mofetil (MMF), un agente inmunosupresor que inhibe la activación de células T por supresión de la síntesis de novo de purinas y previene la infiltración de células inflamatorias. La administración de MMF durante el período de infusión de Ang II no evitó la elevación de presión arterial, sin embargo sí previno la hipertensión durante el periodo de dieta alta en sal, además previno la hipertrofia de vasos preglomerulares, disminuyó la elevación de la resistencia aferente, mejoró el flujo plasmático glomerular y la filtración glomerular por

nefrona. Además disminuyó la infiltración local de linfocitos y macrófagos, así como el daño túbulointersticial, el número de células positivas para angiotensina II. Estos resultados sugieren que los cambios hemodinámicos observados pueden contribuir a la generación de hipertensión sensible a sal a través de varios mecanismos. El incremento en la resistencia aferente producido por la hipertrofia de vasos preglomerulares, la disminución de la filtración glomerular cortical y la disminución del coeficiente de ultrafiltración modifican la relación entre presión arterial y excreción de sodio favoreciendo el desplazamiento de la curva de natriuresis de presión a la derecha y en consecuencia contribuyen a la generación de hipertensión sensible a sal. Por otra parte, los estudios con MMF sugieren que las células inflamatorias pueden contribuir a la HTSS a través de generación local de angiotensina ⁽¹³⁾. (Figura 9)

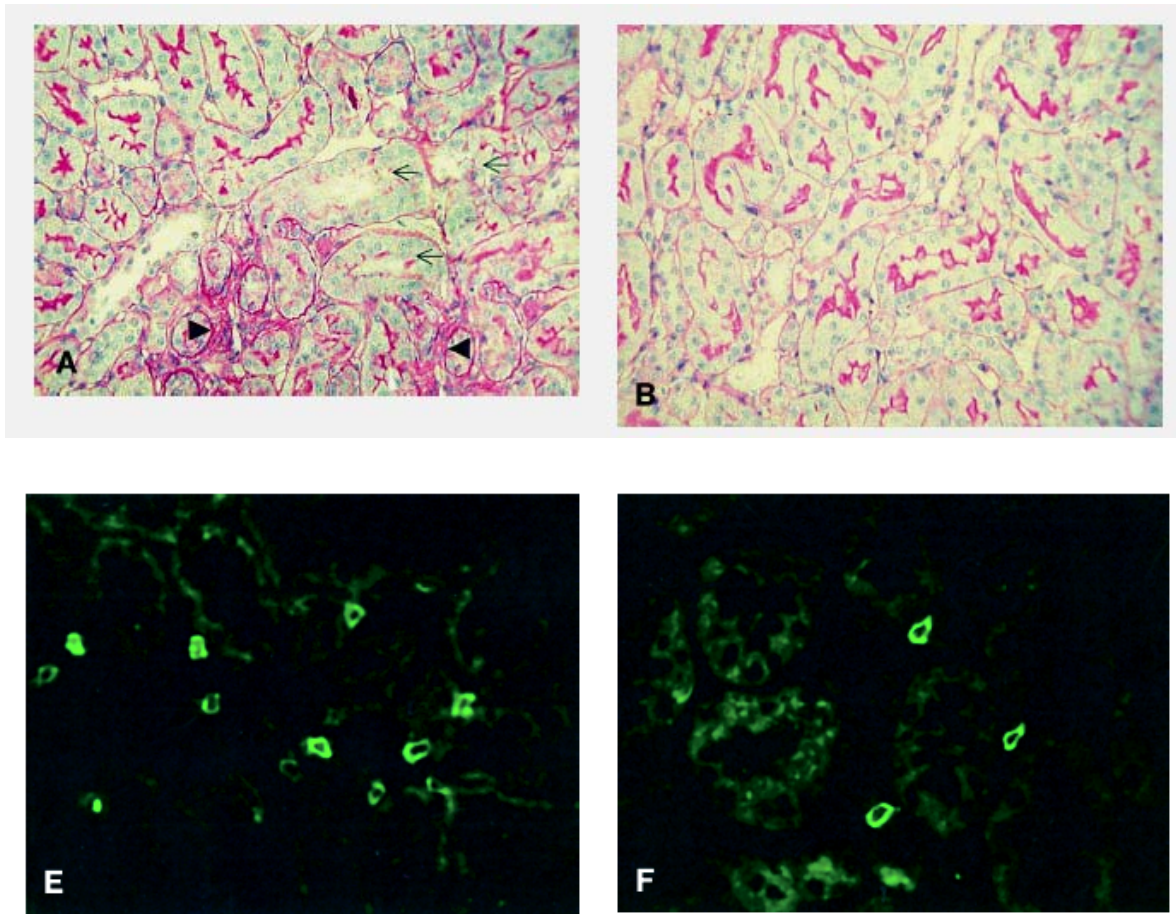


Fig.9. **A.** Cambios estructurales posteriores a la infusión de AngII con daño focal, dilatación tubular y ensanchamiento intersticial esclerótico. **B.** Biopsia de rata con AngII+MMF, en el cual se muestra el tejido renal de características normales. **E.** Infiltración linfocítica (anti-CD5). **F.** Disminución del infiltrado con MMF.

En la Figura 10 se esquematizan los mecanismos que participan en la patogenia de la hipertensión sensible a sal, ante una elevación de la presión arterial, producida experimentalmente por angiotensina, o como resultado de la hiperactividad adrenérgica característica de las etapas tempranas de la enfermedad. La elevación de la presión arterial se trasmite a los capilares peritubulares produciendo isquemia y eventualmente daño túbulointersticial; a nivel de la microcirculación glomerular hay aumento de resistencia aferente,

disminución de la filtración glomerular y del flujo sanguíneo, lo que acentúa la isquemia las lesiones túbulointersticiales.

La activación de células inflamatorias presentes en el túbulointersticio produce liberación local de factores vasoactivos, citocinas y radicales libres de oxígeno que contribuyen a los cambios vasculares. Estos cambios alteran la natriuresis de presión y propician el desarrollo de hipertensión sensible a sal. En pacientes con hipertensión esencial, la sensibilidad a sal afecta al 50%, aunque es más frecuente y más acentuada en pacientes de mayor edad. Además se asocian mayor daño cardiovascular y renal ⁽³⁾.

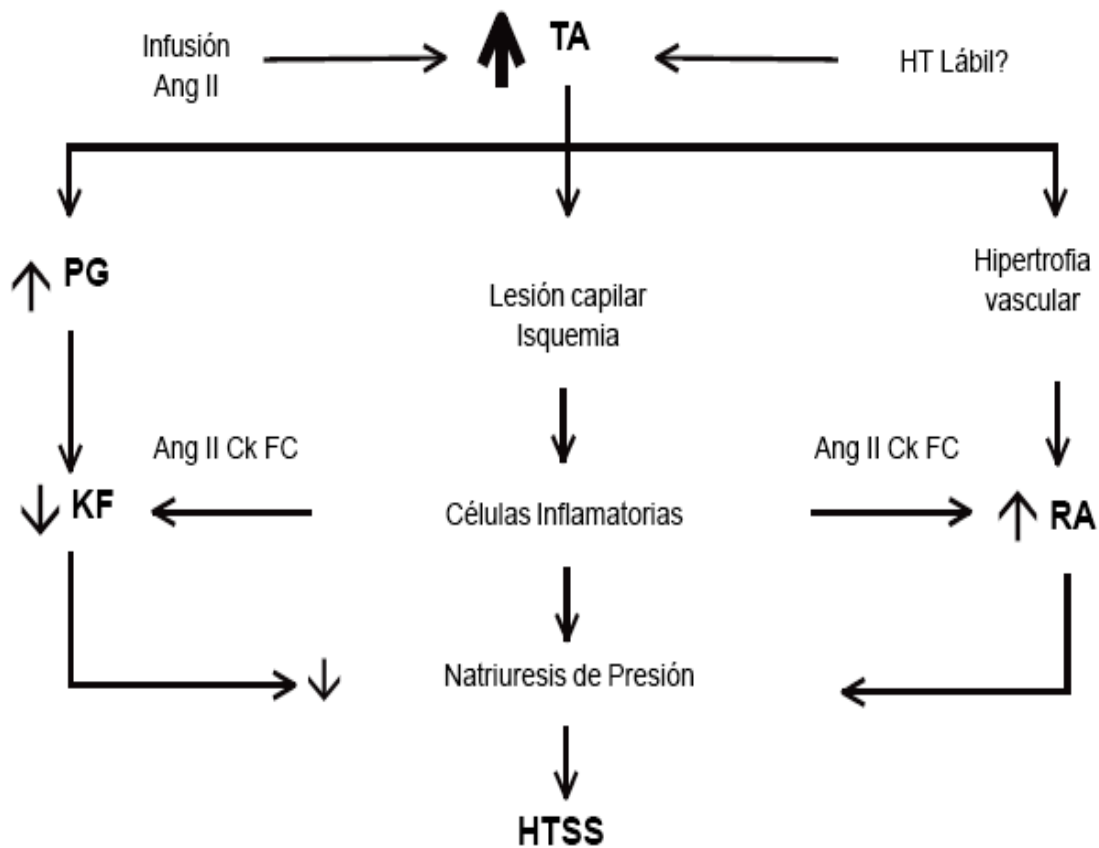


Fig.10 Esquema de los mecanismos que participan en el desarrollo de la hipertensión sensible a sal.

Como se mencionó previamente, se ha demostrado que la hipertensión sensible a sal resulta de daño renal leve, que altera la habilidad renal para excretar sal ⁽¹⁴⁾. Un modelo experimental en el cual esto ha sido demostrado es el de infusión temporal de angiotensina II ^(9, 13). En este modelo, la infusión transitoria de angiotensina II provoca hipertensión con vasoconstricción renal y desarrollo de daño microvascular y túbulointersticial ⁽⁹⁾. De manera relevante, las ratas desarrollan hipertensión sensible a sal posterior a la suspensión de la angiotensina a pesar de mantener la filtración glomerular total normal ^(12,13). Los cambios hemodinámicos están asociados con inflamación túbulointersticial, la cual consiste en infiltración de linfocitos y macrófagos ^(13,15,16,17,37). De manera importante, mediante técnicas de inmunohistoquímica, muchas de las células inflamatorias son positivas con para angiotensina II ^(12,18). La administración de micofenolato de mofetilo (MMF) previene el desarrollo de hipertensión sensible a sal ^(18,19).

Un aspecto importante son los niveles de angiotensina II en este modelo. Habitualmente la dieta alta en sal se asocia con expansión del volumen sanguíneo y reducción de la activación del sistema renina-angiotensina. Sin embargo, se ha descrito que el sistema RAA intrarrenal, funciona como un compartimiento independiente ^(20, 21, 42). Más aún, Ruan et al reportaron que la dieta alta en sal aumenta la respuesta vasoconstrictora a angiotensina II en arteriolas aferentes por aumento de la expresión intrarrenal de receptores ⁽²²⁾. En este trabajo, postulamos que un aumento en la angiotensina II intrarrenal producida por las células del infiltrado intersticial puede ser responsable de la vasoconstricción cortical observada en este modelo.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Es posible que en el modelo de hipertensión renal inducido por administración temporal de angiotensina (14 días) la vasoconstricción renal observada después de 5 semanas con dieta alta en sal, se deba a una elevación de la angiotensina II intrarrenal producida por las células del infiltrado intersticial debido a una alteración del balance del SRA?

JUSTIFICACION

Es fundamental conocer los mecanismos fisiopatológicos involucrados en mantener la hipertensión arterial, dada la importancia de ésta como un problema de salud pública y causa importante de muerte debido a sus complicaciones. Se ha considerado que su origen es multifactorial, participando factores genéticos, medio ambiente y alteración de los mecanismos reguladores de presión arterial.

El desarrollo de hipertensión arterial está íntimamente relacionado con ingesta de una dieta alta en sal. Se ha observado que hasta un 50 a 60% de los pacientes con hipertensión arterial esencial son susceptibles del efecto perjudicial de la sal, además la sensibilidad a sal es un factor de riesgo independiente para una mayor morbimortalidad en comparación con los pacientes que no son sensibles a sal ⁽²³⁾.

Dado que los mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipertensión sólo se conocen parcialmente, el desarrollo de un modelo experimental de hipertensión sensible a sal permitirá estudiar los mecanismos responsables de la disminución en la excreción renal de sal que conduce al desarrollo de hipertensión; específicamente participación de mediadores vasoactivos capaces de alterar la hemodinámica glomerular como la AngII en un período tardío, después de 5 semanas de dieta alta en sal.

HIPÓTESIS

1. El mediador responsable de los cambios hemodinámicos glomerulares (vasoconstricción cortical) en el modelo de hipertensión sensible a sal es la AngII intrarrenal, por lo que el bloqueo del receptor AT1 de AngII con candesartán corregirá la vasoconstricción cortical observada en el modelo de hipertensión sensible a sal.

2. De manera similar, la administración de micofenolato de mofetilo disminuirá la infiltración inflamatoria túbulointerstical, con lo cual se producirá menor cantidad de AngII intrarrenal. En consecuencia será posible prevenir el desarrollo de sensibilidad a sal, la vasoconstricción cortical y los cambios hemodinámicos glomerulares en este modelo.

OBJETIVOS

1.- Evaluar el papel de AngII en las alteraciones hemodinámicas glomerulares en la hipertensión sensible a sal mediante el bloqueo agudo de los receptores AT1 de Ang II con candesartán, después de 5 semanas de dieta alta en sal.

2.- Evaluar el papel de la infiltración inflamatoria túbulointersticial en la vasoconstricción cortical y producción de AngII intrarrenal, al administrar micofenolato de mofetilo .

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo experimental

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho (350 g) a las que se les administró angiotensina II (Sigma, St. Louis, MO) (435 ng/kg/min) durante 2 semanas por vía subcutánea mediante una bomba miniosmótica (Alzet model 2002, Alza Corp. Palo Alto CA) implantada en el dorso del animal⁽¹²⁾. El día 14 la minibomba fue retirada y se permitió la recuperación de las ratas por 5 días con dieta normal en sal (0.4% NaCl). Posteriormente, se les administró dieta alta en sal (Harlan Co, 4% NaCl) por 5 semanas al final de los cuales llevaron a cabo los estudios de micropunción y microdiálisis (Figura 11). El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos del Instituto Nacional de Cardiología.

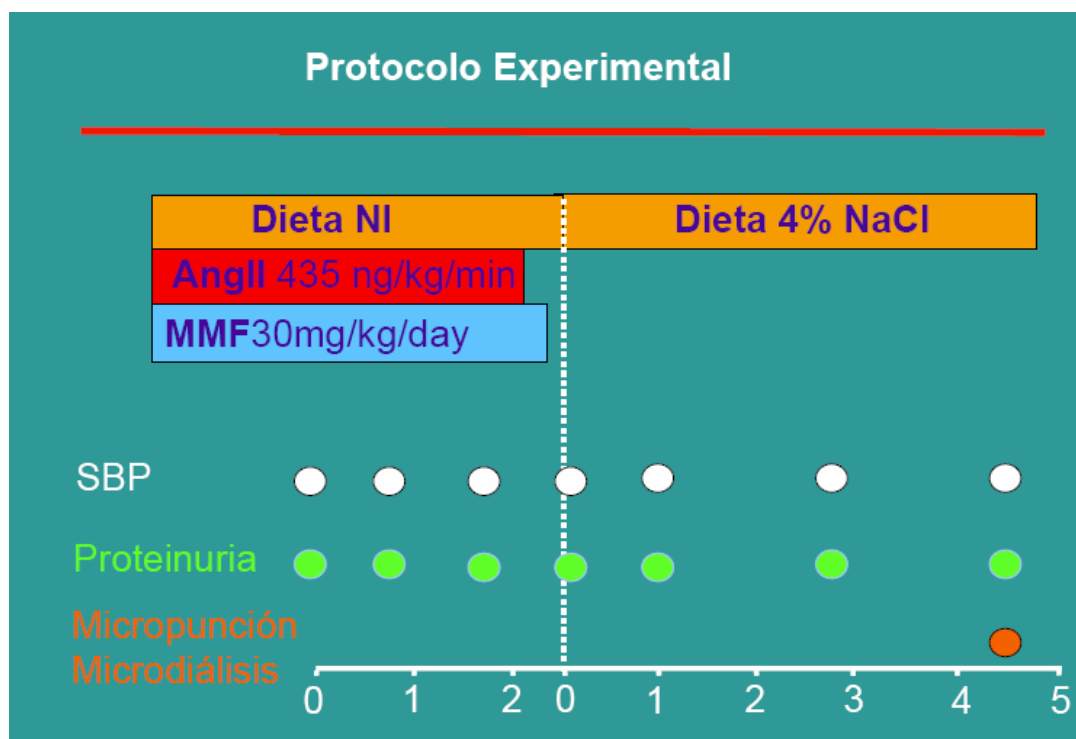


Fig.11. Protocolo experimental

Se realizaron 2 grupos de experimentos:

1. Experimentos de micropunción. Incluyeron los siguientes grupos:

- **Grupo AngII** (n=10). Este grupo recibió angiotensina II 345 ng/Kg/min. Estas ratas recibieron vehículo (0.5 ml de solución salina) 30-40 minutos antes de las mediciones hemodinámicas glomerulares durante la micropunción.

- **Grupo AngII+CAND** (n=9). De manera similar, este grupo recibió angiotensina II 345 ng/Kg/min. Además recibieron una dosis única de 0.25 mg/kg de candesartán diluido en 0.5 ml de solución salina, 30-40 min antes de la medición de hemodinámica glomerular durante la micropunción ⁽²⁴⁾.

- **Grupo AngII+MMF** (n=9). Estas ratas recibieron la angiotensina II como los grupos previos, pero concomitantemente se administró MMF 20 mg /kg peso por sonda gástrica durante la infusión de angiotensina II. Los estudios de micropunción como en el grupo I.

- **Grupo Sham control** (n=10). A estas ratas se les efectuó la cirugía ficticia para la colocación de la bomba y recibieron 5 semanas de dieta alta en sal. La micropunción se efectuó como en el grupo 1.

Medición de presión arterial

Las mediciones de la presión arterial sistólica (PAS) se llevaron a cabo en ratas concientes, colocadas en jaulas de restricción y mediante pletismografía con un manguito colocado en la cola (Narco Biosystems, Austin, TX). Las ratas fueron condicionadas dos veces antes de que la presión arterial fuera medida en periodo basal, cada semana durante las dos primeras semanas y cada dos semanas el resto del estudio.

Experimentos de micropunción

Para los estudios de micropunción (Figura 12), las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, (30 mg/kg, intraperitoneal), administrando dosis suplementarias a requerimiento. Se colocaron 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 selló con agar al 4%. Se cubrió con solución salina tibia y se iluminó con fuente de luz fría. La presión arterial media (PAM) se monitorizó continuamente 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 euvolémicas con infusión de plasma isotónico a 10 ml/kg de peso, seguido de infusión de polifruetosán al 10% (Inutest, Laevosan-Gesellschaft, Austria) en solución salina al 0.9% a 2.5 ml/hr. Después de 60 min. de equilibrio se tomaron 7 muestras cronometradas de líquido tubular del segmento proximal para determinar el flujo tubular y la concentración de polifruetosán. Se midieron la presión hidrostática intratubular al flujo libre y con bloqueo de flujo y las presiones capilares peritubulares en otros túbulos proximales con un equipo "servo-null" (Servo-Nulling Pressure System, Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego, CA), como se ha descrito previamente ⁽²⁵⁾. Se tomaron muestras de sangre periódicamente cada 45-60 min para calcular las concentraciones de polifruetosán y se repuso el

volumen con sangre de una rata donadora, se recolectó la orina por periodos de 60 min.

La presión coloidosmótica glomerular fue estimada en la sangre obtenida de la arteria femoral y de las arteriolas eferentes. Las concentraciones de polifruetosán se determinaron por la técnica de Davidson et al. ⁽³⁸⁾. El volumen de líquido colectado de un túbulo proximal individual fue estimado por la longitud de la columna de líquido en un capilar de calibre uniforme y diámetro interno conocido. La concentración de polifruetosán tubular se midió por el método de Vurek y Pegram ⁽²⁶⁾. La concentración de proteínas en las muestras de la arteriola eferente se eterminó por el método de Viets et al ^(27, 39).

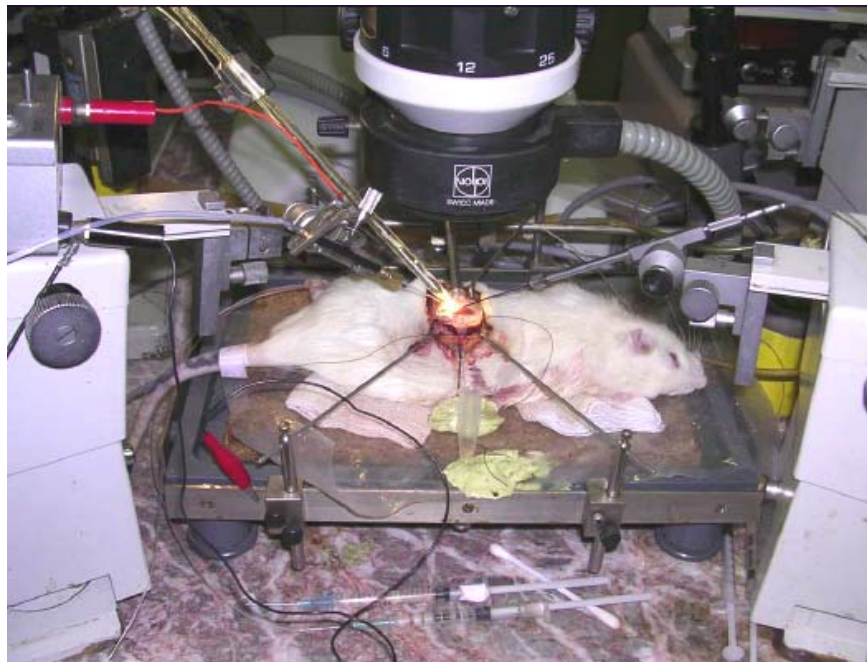


Fig.12 Montaje para micropunción

Se midió la filtración glomerular por nefrona (SNGFR), la presión intratubular con flujo libre (FF) y con bloqueo de flujo posterior a bloquear el lumen tubular con una columna de aceite (SFP, mmHg). Se calcularon: la presión hidrostática del capilar glomerular (PGC), la presión capilar peritubular (PTCP), la presión oncótica aferente (π_A), la presión oncótica eferente (π_E), la presión hidráulica transcápilar (ΔP), la fracción de filtración por neurona, el flujo sanguíneo por neurona, (Q_a), el flujo plasmático (GPF), las resistencias aferente (AR) y eferente (ER,) el coeficiente de ultrafiltración (K_f , nl/s/mmHg). Se calculó la PGC en el método de bloqueo de flujo de acuerdo a la siguiente ecuación: $PGC = SFP + \pi_A$ ^(28,29).

Cálculos de los estudios de micropunción renal

Presión oncótica (π)	$1.76 C + 0.28 C^2$
Filtración Glomerular por nefrona (SNGFR) nl/min	$(TF/P)_{in} \cdot V_{TF}$
Presión capilar glomerular (P_{CG}) mmHg	$SFP + \pi \cdot a$
Presión efectiva de filtración (PEF)	$\frac{(P_{GC} - \pi_a - FF) + (P_{GC} - \pi_e - FF)}{2}$
Coefficiente de permeabilidad (Kf) nl.s.mmHg	$\frac{SNGFR/60}{PEF}$
Fracción de filtración por nefrona (SNFF)	$\frac{1 - CA}{CE}$
Flujo plasmático por nefrona (Q_A) nl/min	$\frac{SNGFR}{SNFF}$
Flujo sanguíneo por nefrona (GBF) nl/min	$\frac{Q_A}{1 - Hcto}$
Resistencia aferente (R_A) dyn.s.cm ⁻⁵	$\frac{MAP - PGC}{GBF} \times (7.962)$
Resistencia eferente (R_E) dyn.s.cm ⁻⁵	$\frac{PGC - PGC_x}{GBF - SNGFR} \times (7.962)$
Presión Hidráulica transcapilar (ΔP) mmHg	$P_{CG} - P_T$

C= Concentración de proteínas

FF = Presión tubular

TF/P = Relación túbulo/plasma de polifruetosán

SFP = presión tubular con flujo detenido (presión capilar glomerular)

CA= Concentración de proteínas aferente

CE= Concentración de proteínas eferente

QA= Flujo plasmático

GBS = Flujo sanguíneo glomerular

Pc = Presión hidrostática en los capilares peritubulares

Determinaciones de angiotensina II renal

La concentración de AngII renal se determinó en la corteza renal por microdiálisis (Figuras 13 y 14), de acuerdo al método descrito por Nishiyama et al. y Fox et al. ^(20, 21). Para este procedimiento, grupos adicionales de 9 ratas cada uno se estudiaron al final del seguimiento (7 semanas); las ratas normales en dieta estándar se incluyeron para determinar los valores de AngII en nuestro laboratorio. La preparación quirúrgica de los animales fue idéntica a la decrita previamente en los estudios de micropunción ^(25, 28). Además, se colocó una sonda de polisulfona para microdiálisis de 10 mm de longitud (Fresenius Medical Care, USA) en la corteza renal superficial, con un coeficiente de difusión transmembrana de 33,000-DA ^(21, 22). Se insertaron mini agujas de acero en ambas terminaciones de la fibra. La entrada de la sonda se conectó a un tubo de polietileno (PE-10) y de ahí a una bomba de microinfusión (Harvard apparatus, USA). La sonda se perfundió con solución Ringer la cual contenía albúmina sérica bovina al 1% (pH

7.4) a una velocidad de infusión de 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. El dialisado fue colectado directamente de la salida de la sonda en un tubo que contenía una solución de inhibidores (30 μl de EDTA 500 mM, 15 μl de enalaprilat 1mM y 30 μl de α -phenantrolene 125 M y pepstatin A 0.2 mM in 95 % etanol), para permitir al líquido dialisado mezclarse inmediatamente con los inhibidores. Después de 90 minutos de la implantación de la sonda, se tomaron 3 muestras cada 60 min. Inmediatamente después, cada muestra fue agitada vigorosamente y 100 μl de la solución se transfirieron a un tubo con 1 ml de metanol al 100% refrigerado. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta ser analizadas. La eficiencia de la sonda de microdiálisis se determinó *in vitro*, a una tasa de perfusión de 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, la tasa de equilibrio relativa fue de $66 \pm 2\%$.

La determinación de AngII se llevó a cabo por inmunoenzayo competitivo vinculado a enzima (competitive enzyme-linked immunoassay; ELISA) usando un kit comercial (SPI Bio, Bertin Group, France), siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante y de acuerdo al método descrito por Nishiyama et al. y Fox et al. ^(20,21). Las muestras de líquido dializado en metanol se evaporaron con nitrógeno, se reconstituyeron con buffer y se estudiaron posterior a la extracción en cartuchos de fenilo; se usó una curva estándar de 8 puntos (0 to 125 pg/ml). Las variaciones intra e inter estudio fueron de 3.93 ± 0.56 y $5.10.70 \pm 0.58$, respectivamente. Los resultados se expresaron en pg/ml. No hubo reactividad cruzada con Ang I, Ang 1-7, Ang 3-8 o Ang III.



Fig.13. Montaje de microdiálisis

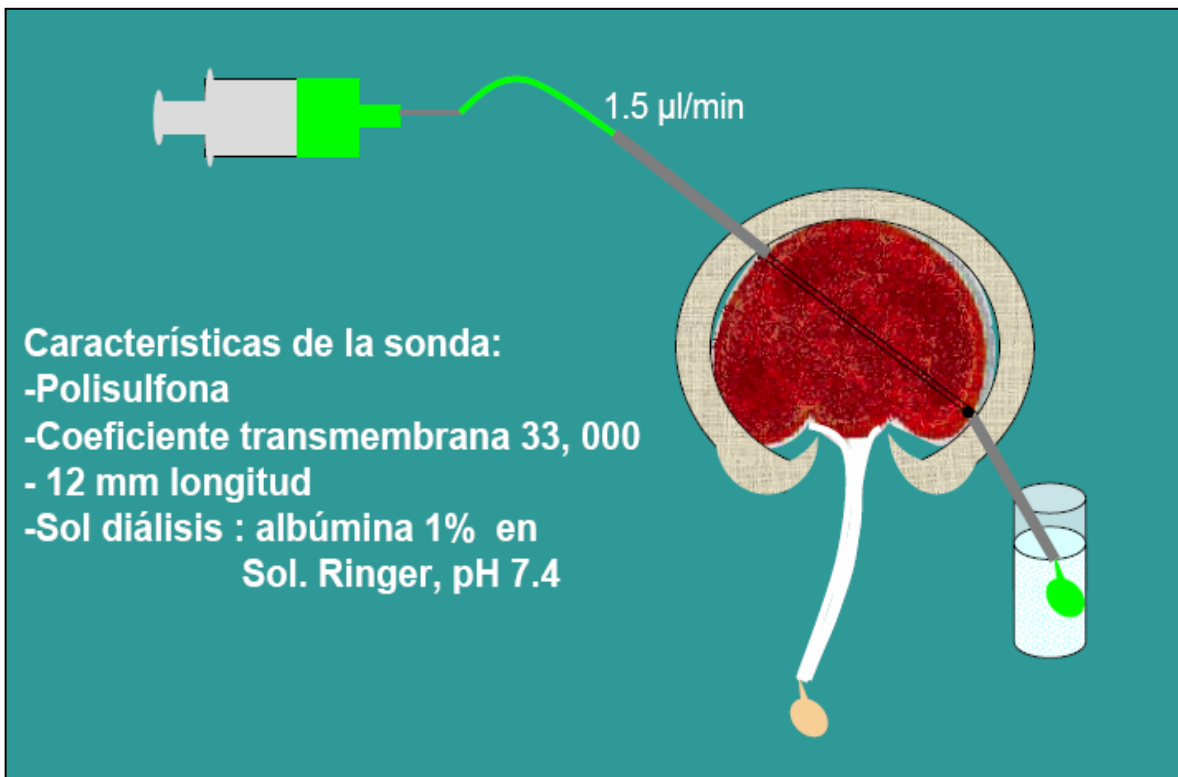


Fig.14. Técnica de microdiálisis

Estudios histológicos

En siete ratas de cada grupo, se obtuvieron cortes coronales del riñón izquierdo al momento de sacrificarlas. Los fragmentos se fijaron en formalina al 10% y se incluyeron en parafina. La infiltración de macrófagos y linfocitos se estudió con técnica de inmunoperoxidasa ^(17, 30). Los tejidos fueron lavados e incubados sucesivamente con 20 ml de ExtraAvidin (2.5 mg/ml; Sigma, St, Louis MO) y en 30 ml de biotina al 0.001% en solución salina con buffer fosfato (PBS). Posteriormente, los tejidos se incubaron por 2 hrs a 37°C con 50 ml del anticuerpo monoclonal correspondiente (ver abajo), diluido 1:30 en buffer Tris salina (TSB), a pH de 7.8. Posterior al lavado en TSB por 15 min, los tejidos se incubaron por 1 hr con 30 ml de fragmentos unidos a biotina de IgG antiratón (ab') con mínima reactividad cruzada con proteínas séricas humanas, equinas y murinas (Accurate Chemical Corp. Westbury, NY). Finalmente, se incubaron con 60 ml de Extravidina conjugada con peroxidasa por 30 min. Después del lavado final, los tejidos se incubaron por 15 min con diaminobenzidina y H₂O₂ en TBS.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti CD5 (anticuerpo monoclonal murino anti-linfocito de rata) y anti ED-1 (anticuerpo monoclonal murino anti-macrófago de rata), comprados de Biosource International (Camarillo, CA). La infiltración celular se evaluó en áreas túbulointersticiales y expresada como células positivas por sección transversa glomerular o células positivas por milímetro cuadrado (mm²).

DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, prospectivo, longitudinal

ANALISIS ESTADISTICO

- Los grupos se evaluaron con análisis de varianza de una vía (one way ANOVA) seguida de postprueba de Tukey-Kramer
- La significancia estadística se definió con una $p < 0.05$.
- Los resultados en tablas y figuras se expresan como la media \pm EEM.

RESULTADOS

La hipertensión sensible a sal se asocia con un aumento en la AngII intrarrenal e inflamación túbulointersticial.

Las ratas a las que se les infundió AngII durante 14 días, desarrollaron hipertensión sistólica, la que disminuyó al retirar la minibomba; al alimentarles con dieta alta en sal desarrollaron nuevamente hipertensión como se ha descrito previamente ^(9, 12). Las ratas control que recibieron MMF durante la infusión de AngII, desarrollaron hipertensión durante la infusión de angiotensina, y se mantuvieron con hipertensión limítrofe durante la dieta alta en sal. Las ratas Sham no desarrollaron hipertensión durante la administración de la dieta alta en sal (Figura 15).

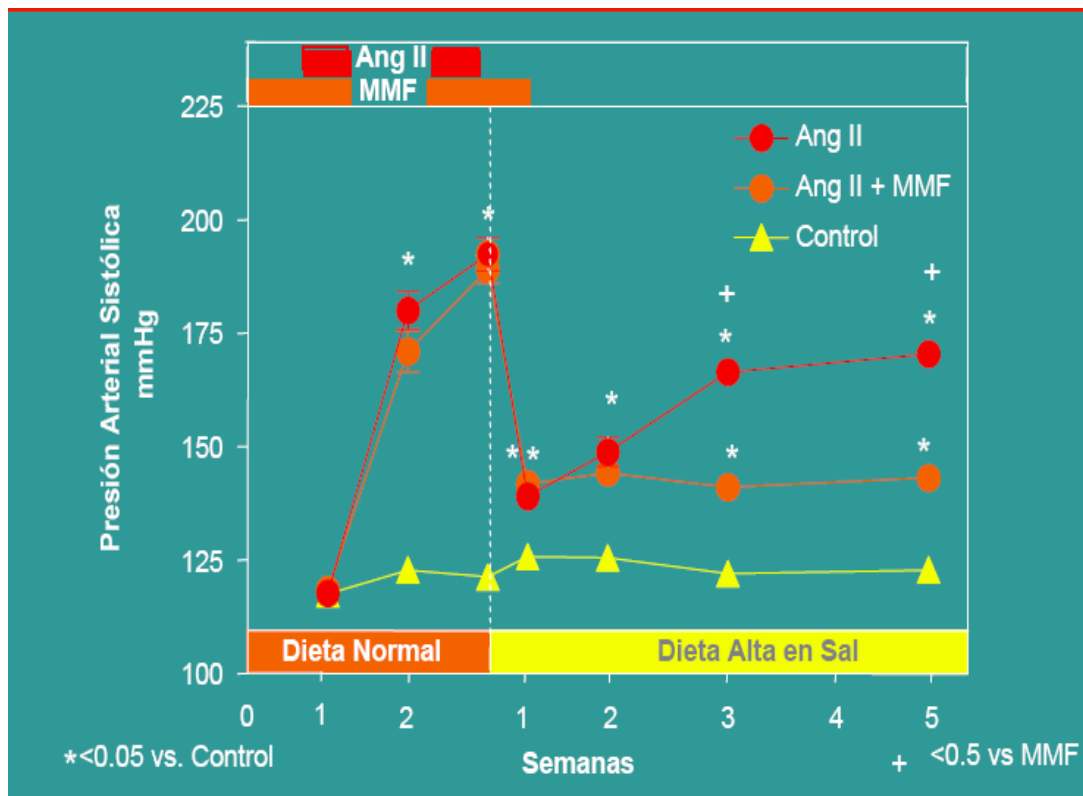


Fig. 15

Efectos del candesartán en la hemodinámica renal

Para evaluar el papel funcional de la AngII en la fase de hipertensión sensible a sal, se estudió la hemodinámica glomerular posterior a la administración aguda de candesartán.

La administración de AngII seguida de una dieta alta en sal produce vasoconstricción cortical importante con aumento de las resistencias aferente y eferente, asociado con una reducción en el SNGFR y el flujo sanguíneo, después de 5 semanas de suspendida la angiotensina y a pesar de la dieta alta en sal. Estos hallazgos se encuentran significativamente disminuidos en ratas tratadas con MMF (Figura 16). La administración aguda de candesartán, a pesar de que disminuye la presión arterial produce una disminución de las resistencias aferente y eferente, asociado con un aumento del flujo sanguíneo y de la filtración glomerular por nefrona. (Figura 16). De manera similar, el coeficiente de ultrafiltración (Kf) se redujo en el grupo de AngII (grupo AngII = 0.027 ± 0.001 , vs Sham = 0.034 ± 0.001 , $p < 0.05$) pero se incrementó significativamente en ratas tratadas con MMF (0.033 ± 0.002) y en el grupo de AngII que recibió el bolo agudo de candesartán (0.033 ± 0.001). De hecho, el aumento en el Kf en estos grupos fue similar al observado en el grupo control (0.034 ± 0.001).

En contraste a las ratas que recibieron AngII, en las ratas con AngII+MMF la administración de candesartán se asoció a una falta de respuesta de las resistencias aferente y eferente, que tuvieron valores las ratas AngII+MMF que reciben vehículo. Sin embargo, la disminución de la presión arterial media se asoció a una caída del flujo plasmático, la PCG, la SNGFR y el Kf (26, 13, 22 y 20 % respectivamente), comparado con el grupo AngII+MMF+vehículo. Efectos

similares se observaron en las ratas control. (Tabla 1, Figura 16).

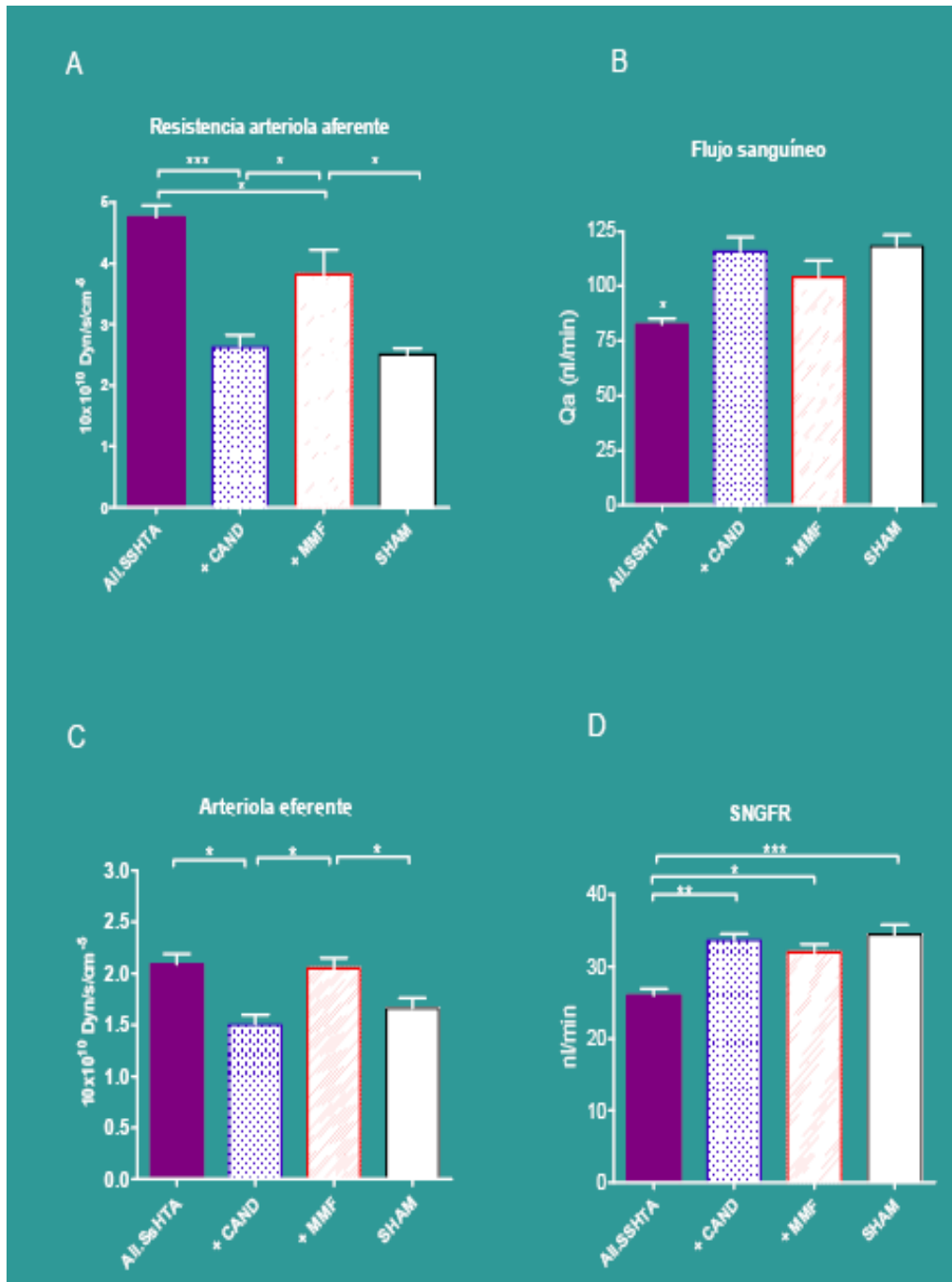


Fig.16 Cambios en la hemodinámica glomerular en los grupos de ratas estudiados.

Infiltración túbulointersticial

La Tabla 1 muestra los resultados de los estudios de inmunohistoquímica realizados para valorar la infiltración de células inflamatorias (CD5+ linfocitos; ED-1+ macrófagos) en glomérulo e intersticio renal. Nuestros resultados demostraron un aumento significativo en la infiltración de células inflamatorias en el grupo de AngII, principalmente en intersticio; además, se observó disminución en las células inflamatorias tanto CD5+ como ED-1+ en las ratas a las cuales se les administró MMF; el candesartán no modificó la infiltración celular ^(13, 17).

Grupo	Células CD-5+/corte transversal glomerular		Células ED-1+ /mm2	
	Glomérulo	Intersticio	Glomérulo	Intersticio
Ang II	0.65 ± 0.05*	45.41 ± 1.3*	0.33 ± 0.11	30.87 ± 1.2*
Ang II + Cand	0.56 ± 0.08 *	45.03 ± 1.7*	0.32 ± 0.49	29.98 ± 2.1*
AngII + MMF	0.37 ± 0.40	19.68 ± 0.9	0.21 ± 0.67	15.52 ± 0.8
Sham (control)	0.28 ± 0.07	19.92 ± 1.9	0.25 ± 0.95	22.00 ± 0.7

* p < 0.05 vs. Sham

Tabla1. Infiltración de células inflamatorias glomerulares e intersticiales después de 5 semanas en ratas con dieta alta en sal con hipertensión sensible a sal, ratas con MMF y ratas control.

Angiotensina II intersticial

La concentración de AngII en líquido intersticial renal después de 5 semanas de dieta alta en sal se muestra en la Figura 17. Los niveles de AngII intrarrenal se encontraron muy elevados en ratas con infusión de angiotensina II; en las ratas con angiotensina II tratadas con MMF la angiotensina se redujo significativamente, aunque permanecieron más altos comparado con las ratas control.

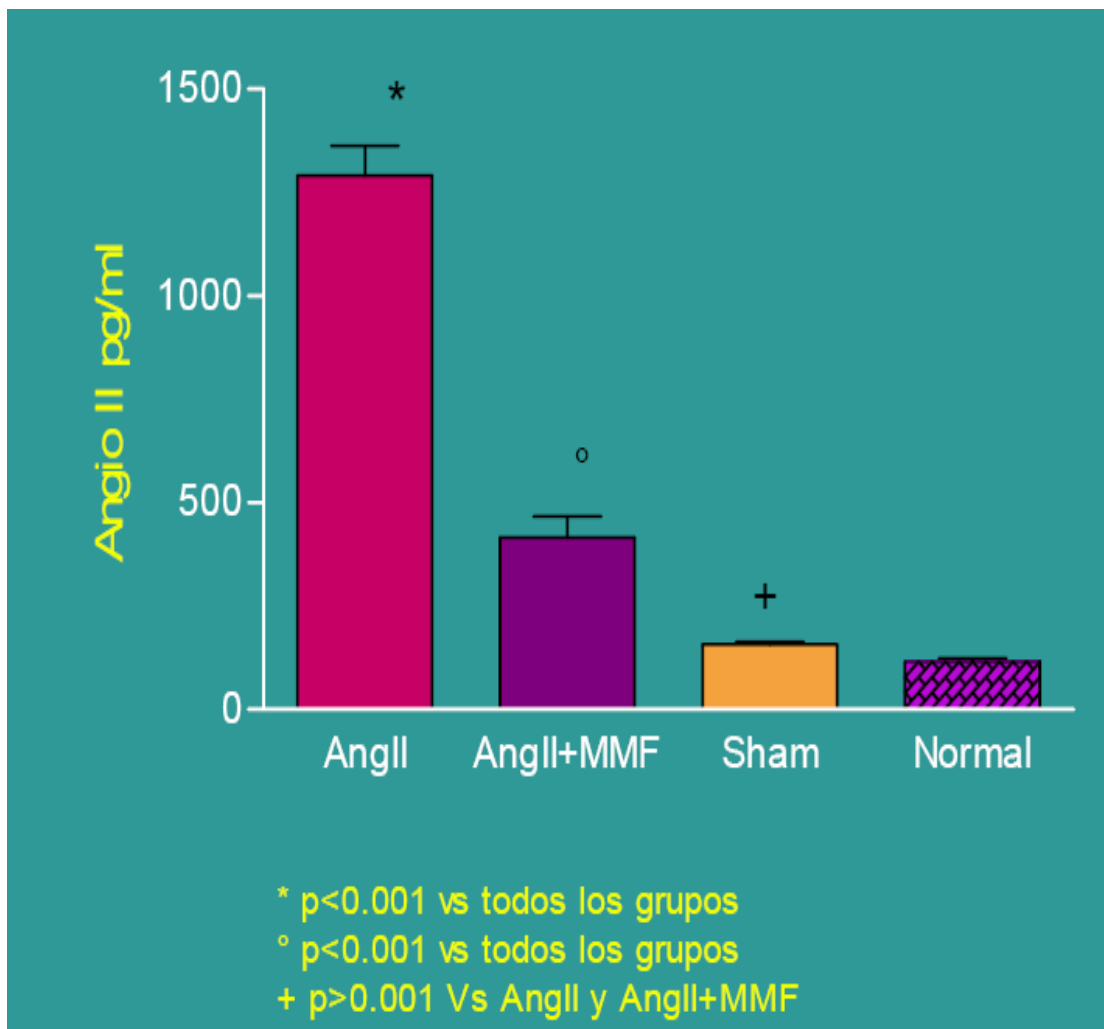


Fig.17 Concentraciones de AngII en los grupos estudiados

Los niveles de AngII intrarrenal se correlacionaron con el grado de hipertensión (Figura 18), así como con el número total de células CD5+ (Figura 19) cuando todos los grupos fueron combinados.

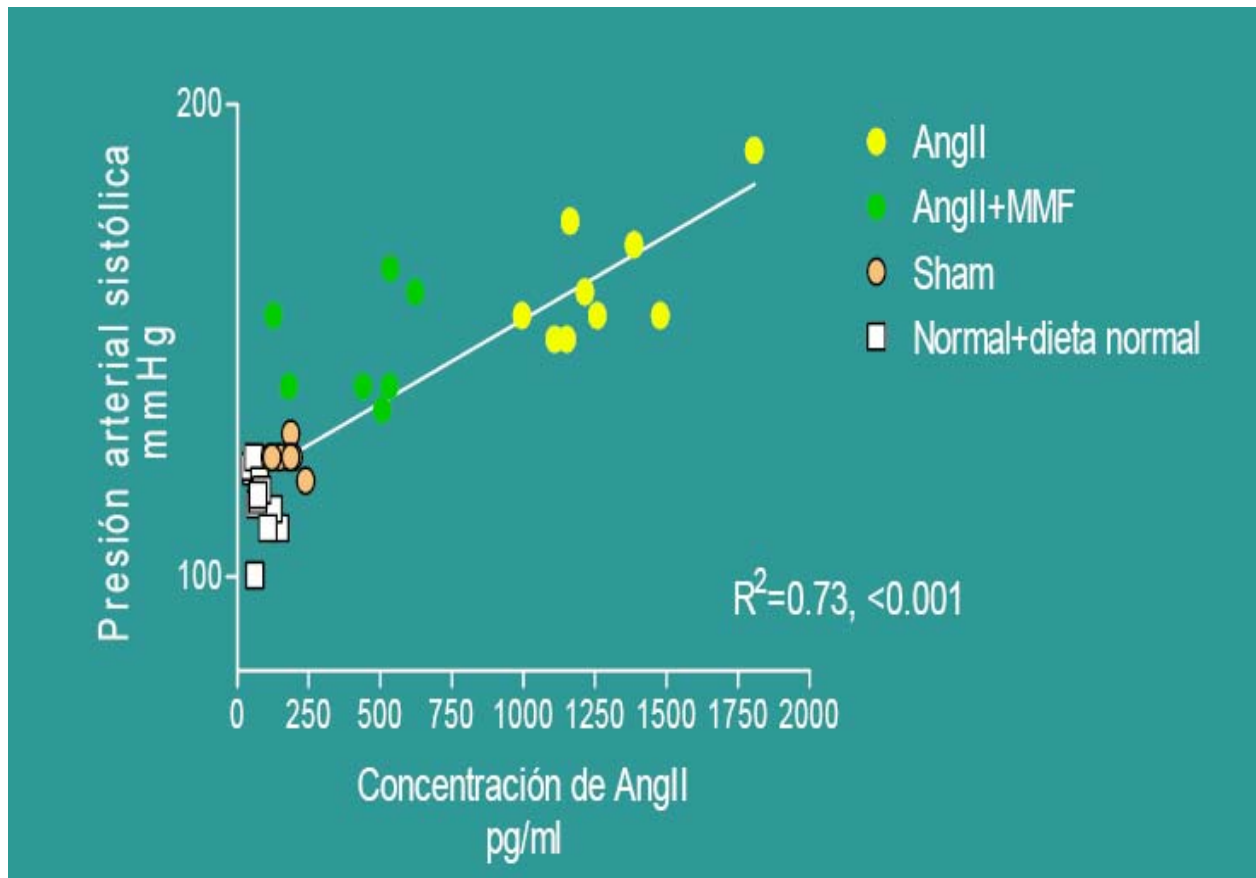


Fig.18 Correlación entre la concentración de angiotensina II y el desarrollo de sensibilidad a la sal.

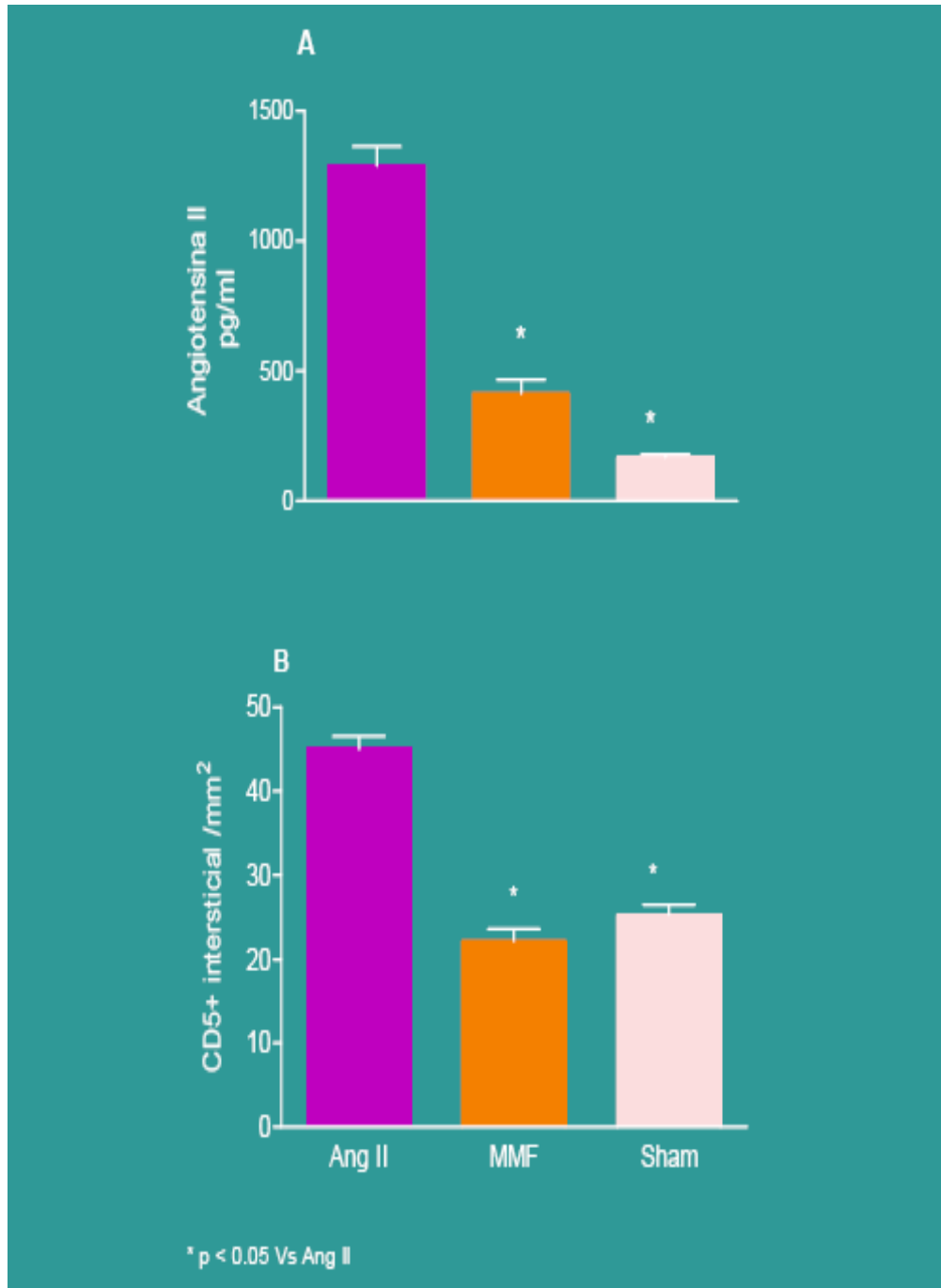


Fig.19 A: Concentraciones de AngII en los grupos estudiados. **B:** Células intersticiales CD5+ en los grupos estudiados.

DISCUSION

La sensibilidad a sal contribuye a elevación de la presión arterial en una gran proporción de pacientes con hipertensión esencial⁽¹²⁾. Esto sugiere una alteración en la capacidad del riñón para excretar sodio y por lo tanto, requiere una mayor presión de perfusión. Dicha alteración puede ser producida por cambios funcionales y alteraciones estructurales⁽¹⁴⁾.

Se ha propuesto que la lesión microvascular y el daño inflamatorio intersticial de mínima intensidad son capaces de inducir hipertensión sensible a sal. Desde el punto de vista clínico, la ciclosporina utilizada en trasplante renal, la edad avanzada, las dietas bajas en potasio, la raza negra, la obesidad y la diabetes, son algunos de las entidades en las que se ha observado hipertensión sensible a sal^(3, 14).

Desde el punto de vista experimental existen varios modelos de hipertensión sensible a sal, como el de infusión crónica de fenilefrina y de angiotensina II, bloqueo del óxido nítrico con L-Name etc. que producen cambios estructurales y funcionales en el riñón que inducen hipertensión dependiente de sal^(9, 13,17,19, 30,40,41).

Un hallazgo clave en estos modelos es la presencia de isquemia renal y la infiltración de linfocitos y macrófagos capaces de producir radicales libres de oxígeno y AngII^(16, 24, 31, 32, 33, 34). De hecho, el bloqueo de la infiltración de células inflamatorias con agentes tales como MMF^(12,18), o la inhibición de radicales libres de oxígeno⁽³⁵⁾, puede mejorar la hipertensión sensible a sal.

Se ha reportado que el contenido de angiotensina II intrarrenal en el líquido del túbulo proximal e intersticial es mucho mayor que los niveles circulantes de esta

hormona ^(21,22). Esta alta concentración de angiotensina II es responsable de la regulación del transporte tubular.

Las concentraciones en el líquido tubular y en el intersticio son mayores de 3-10 pmoles/ml. En estados hipertensivos, existe acumulación intracelular de angiotensina II mediada por endocitosis dependiente de receptor tipo 1 de angiotensina ⁽⁴⁶⁾. Cuando la concentración de AngII intrarrenal se eleva como resultado de estímulos inapropiados, contribuye a una retención excesiva de agua y sodio, con el consecuente desarrollo de hipertensión y efectos proliferativos que a largo plazo, causan daño renal ⁽⁴⁵⁾.

Aunque se ha propuesto un papel importante de la AngII intrarrenal en este proceso, basado en la presencia de células positivas para angiotensina II, no se había realizado un estudio formal para comprobar esta hipótesis. En este trabajo examinamos el papel de la AngII en un modelo de hipertensión sensible a sal en el cual el daño renal es inducido por exposición breve a angiotensina II.

Específicamente, la infusión de AngII por dos semanas resulta en el desarrollo agudo de hipertensión con daño microvascular y túbulointersticial.

Mientras que la suspensión de la infusión de AngII provoca resolución de la hipertensión, la exposición subsecuente a una dieta alta en sal resulta en una rápida reaparición de la hipertensión. Este mecanismo mostró estar asociado con vasoconstricción cortical ⁽¹²⁾ y con infiltración de células inflamatorias ^(12, 13).

La administración de MMF fue capaz de prevenir la hipertensión sensible a sal, la vasoconstricción cortical y los cambios inflamatorios intersticiales renales, lo cual concuerda con resultados obtenidos previamente, en los cuales el MMF no

modifica la hipertensión inducida por la administración aguda de AngII exógena, pero si previene el desarrollo de HTASS ^(12,13).

Con el fin de evaluar el papel funcional de la AngII en el modelo de hipertensión sensible a sal, estudiamos los efectos de la administración aguda de candesartán. Como se muestra en la figura 16, el candesartán fue capaz de revertir la vasoconstricción cortical sugiriendo que este estado fisiopatológico está mediado por el receptor AT1 ⁽²²⁾. Se observaron efectos similares con el Kf, en el cual hubo una corrección casi completa como la observada en los controles. Este estudio provee también evidencia de que la angiotensina II intrarrenal juega un papel fundamental en el mantenimiento de la vasoconstricción cortical y la retención de sodio. Se han observado hallazgos similares en experimentos de expansión de volumen ⁽²¹⁾ y en nefritis intersticial ⁽¹⁵⁾.

En este estudio demostramos que este modelo se asocia con un aumento de los niveles de angiotensina II renales. Ya que estos animales recibieron una dieta alta en sal con lo que se suprime el sistema renina-angiotensina sistémico, los hallazgos representan un ejemplo de cómo la angiotensina intrarrenal puede estar disociada de la plasmática.

La posibilidad de que la angiotensina II intrarrenal sea la responsable de la vasoconstricción cortical se apoya en parte, en la alta correlación entre el nivel de angiotensina II, la presión sanguínea (Figura 18) y la respuesta inflamatoria intersticial. Mientras que la producción de angiotensina II por parte de células tubulares como respuesta a reactividad inflamatoria no ha sido estudiada, una fuente probable de angiotensina II intrarrenal son las células inmunes del infiltrado

inflamatorio, lo cual ha sido demostrado en estudios previos por inmunohistoquímica positiva para angiotensina II ^(13, 18).

La observación de que los niveles de AngII renal se reducen por MMF (no obstante que las ratas recibieron la misma dosis de AngII) descarta la posibilidad de que la angiotensina II intrarrenal represente a la angiotensina II exógena administrada 6 semanas antes.

Nuestros resultados sugieren que la AngII renal es la responsable de los cambios hemodinámicos glomerulares en la hipertensión inducida por sal que sigue a la administración exógena de angiotensina, y que ésta pueda ser producida por las células del infiltrado túbulointersticial. La participación potencial de una supresión incompleta de la AngII circulante no fue evaluada⁽³⁶⁾.

CONCLUSIONES

En conclusión:

Demostramos a nivel funcional, que la vasoconstricción renal observada en el modelo de hipertensión sensible a sal puede ser revertido por un bloqueador de los receptores AT1 de angiotensina, lo que nos sugirió a la angiotensina como el posible mediador.

Demostramos que los niveles de AngII intrarrenal se encuentran elevados en este modelo y que existe correlación con la presencia de inflamación intrarrenal, misma que puede ser evitada por el MMF, con lo que disminuyen los valores de angiotensina intrarrenal.

Estos estudios concuerdan con la hipótesis de que el sistema angiotensina intrarrenal local juega un papel fundamental en este modelo de hipertensión sensible a sal.

REFERENCIAS

1. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung and Blood Institute. Publicación on-line.
2. United States Renal Data System. Annual report 2006. Publicación on-line.
- 3.- Herrera J. Hipertensión arterial dependiente de sal. Arch Cardiol Mex 2001;71:76-80
- 4.- Weinberger M, Fineber N. Sodium and volume sensitivity of blood pressure. Age and pressure change over time. Hypertension 1991; 18: 67-71
- 5.- Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D. Microalbuminuria in salt-sensitive patients: A marker for renal and cardiovascular risk factors. Hypertension 1994;23:195-199
- 6.- Bihorac A, Tezcan H, Özener C. Association between salt-sensitivity and target organ damage in essential hypertension. Am J Hypertens 2000; 13: 864-872
- 7.- Weinberger MH. Salt-sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? Curr Opin Neph Hypertens 1996;5:205-208
8. Mai M, Geiger H, Hilfens KF. Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury. Hypertension 1993; 22:754-765
- 9.- Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson RJ. Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to Angiotensin II. Hypertension 33:1013-1019, 1999.
10. Sommers S, Relman R, Smithwick R. Histologic studies of kidney biopsy specimens from patients with hypertension. Am J Pathol 1958; 34:685-715

- 11.- Johnson RJ, Schreiner GF. Hypothesis: The role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Kidney Int* 1997;52:1169-1179
- 12.- Franco M, Tapia E, Santamaria J. Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt sensitive hypertension after angiotensin II exposure: *J. Am. Soc. Nephrol* 12:2263-2271, 2001.
- 13.-Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Gordon K, Rincon J, Chávez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gomez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ: Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. *Kidney Int.* 59:2222-32, 2001.
- 14.- 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* 346: 913-923, 2002.
- 15.-Vanegas V, Ferrebuz A, Quiroz Y, Rodriguez-Iturbe B. Hypertension in Page (cellophane-wrapped) kidney is due to interstitial nephritis. *Kidney Int* 68:1161-1170, 2005.
- 16.- Reckelhoff JF, Romero JC: Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension, *Am J Physiol* 284:R893.R912, 2003.
- 17.- Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, Bonet L, Chavez 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* 282:F191-F201, 2002.

- 18.- Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez 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.
- 19.-Romero F, Rodríguez-Iturbe B, Parra G., González L 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.
- 20.- Fox J, Guan S, Hymel AA, Navar LG. Dietary Na and ACE inhibition effects on renal tissue angiotensin I and II and ACE activity in rats. *Am J Physiol.* 262:F902-F909, 1992.
- 21.- Nishiyama A, Seth DM, Navar LG: Renal interstitial fluid concentrations of angiotensin I and II in anesthetized rats. *Hypertension* 39:129-134, 2002.
- 22.-Ruan X, Wagner C, Chatziantoniou C, Kurtz A, Arenshorts WJ. Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J. Clin. Invest.* 99:1072-1081, 1997
- 23.- Weinberger M, Fineber N, Fineber E. Salt sensitivity, pulse pressure and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension* 37:429-432,2001.
- 24.- Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of Ang II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase and SOD expression. *Am. J. Physiol.* 285:R117-R124, 2003.
- 25.- Blantz RC, Tucker BJ: Measurements of glomerular dynamics. In *Methods in Pharmacology*, edited by Martinez Maldonado M, Plenum Publishing Corporation, 1978, pp 141-163.

- 26.- Vurek GG, Pegram SE. Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin. *Anal Biochem* 16:409-419, 1966.
- 27.- Viets JW, Deen WM, Troy JL, Brenner BM. Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 88:513-521, 1978.
- 28.-Azar S, Tobian L, Johnson MA. Glomerular, efferent arteriolar, peritubular capillary, and tubular pressures in hypertension. *Am. J. Physiol.* 227:1045-1050, 1974.
- 29.- Deen WM, Troy JL, Robertson CR, Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. IV. Determination of the ultrafiltration coefficient. *J Clin Invest* 52:1500-1508, 1973.
- 30.- Rincon J, Parra G, Quiroz Y, Benatuil L, Rodriguez-Iturbe B: Cyclosporin A reduces expression of adhesion molecules in the kidney of rats with chronic serum sickness. *Clin Exp Immunol.* 121:391-398, 2000
- 31.- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 290:33-40, 1993.
- 32.-NakagawaT, Kang DH, Oashi R, Suga S, Herrera-Acosta J. Rodríguez Iturbe B, Johnson RJ. Tubulointerstitial disease: role of ischemia and microvascular disease. *Curr Op. Nephrol & Hypertens.* 12:233-242, 2003
- 33.- Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J, Ogihara T: Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J. Hypertension* 17: 537-545, 1999.

- 34.-Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest* 97:1916-1923, 1996.
- 35.- Varizi ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DI. Effect of antioxidant therapy on blood pressure, and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 36:957-964, 2000.
- 36.- Hu L, Sealey JE, Chen R, Zhou Y, Merali C, Shi Y, Laragh JH, Catanzaro DF. Nitric oxide synthase inhibition accelerates the pressor response to low-dose angiotensin II, exacerbates target organ damage, and induces renin escape. *Am. J. Hypertens* 17:395-403, 2004.
- 37.- Alvarez V, Quiroz Y, Nava M, Pons H, Rodriguez-Iturbe B. Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1132-F1141, 2002.
- 37.- Cervenka L, Wang CT, Navar LG. Effects of acute AT1 receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats. *Am J Physiol* 274:F940-F945, 1998.
- 38.- Davidson WD, and Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62:351-356, 1963.
- 39.- Henry RJ, Segalove M, Sobel C. Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92:748-751, 1956.

- 40.-Johnson RJ, Gordon KL, Suga S, Duijvestijn AM, Griffin K, Bidani A. Renal injury and salt-sensitive hypertension after exposure to catecholamines. *Hypertension* 34, 151-159, 1999.
- 41.-Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM. Renal interstitial fluid angiotensin. Modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion and renin inhibition. *Hypertension* 25:1021-1024, 1995.
- 42.- Siragy HM,. Angiotensin II compartmentalization within the kidney: effects of salt diet and blood pressure alterations. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 15(1) :50-53, 2006
- 43.- Weinstock JV, Blum AM: Synthesis of angiotensins by cultured granuloma macrophages in murine schistosomiasis mansoni:*Cell Immunol* 1107:273-80, 1987
- 44.- Weinberger M, Fineber N, Fineber E. Salt sensitivity, pulse pressure and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension* 37:429-432,2001.
- 45.- Navar G, Nishiyama A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney?. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13(1):107-115, 2004
- 46.- Zhuo J, Imig J, Hammond T. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor. *Hypertension.* 39: 116-121, 2002