

Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vasculatura renal de ratas hipertensas.

Mayor M.C. M. en C. Carlos Armando **Sosa-Luna**,* M.C. M. en C. Horacio **Astudillo-de la Vega**,***
Mayor M.C. M. en C. Dolores Javier **Sánchez-González**,**** Mayor M.C. M. en C. Sergio Gabriel
Martínez-Salas,***** Tte. Cor. M.C. M. en C. Ramón **Valdez-Espinosa**,*****
Dr. en C. Rafael **Villalobos-Molina**,***** Dr. en C. Maximiliano **Ibarra-Barajas****

Escuela Militar de Graduados de Sanidad y Escuela Médico Militar. Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos.
Facultad de Estudios Superiores Campus Iztacala, Unidad de Biomedicina, UNAM.

RESUMEN

Antecedentes. A pesar de que la hipertensión esencial (HTAS) es un problema de salud pública y que existe un gran número de publicaciones relacionadas con el tema, la etiología de la misma es todavía desconocida. El desequilibrio entre diferentes agentes vasoconstrictores y vasodilatadores ha sido propuesto como el aspecto fisiopatológico esencial de la hipertensión, además de que el estrés oxidativo y el estrés por cizallamiento juegan un papel primordial.

Objetivo. Determinar si existen diferencias en la reactividad vascular renal a la estimulación α_1 -adrenérgica con fenilefrina al comparar curvas concentración-respuesta entre las ratas WKY (normotensas) con las SHR (ratas hipertensas) en las edades de tres y seis meses.

Método. Se utilizó la metodología de riñón aislado perfundido y el polígrafo BIOPAC® para construir curvas concentración-respuesta, en presencia de L-NAME inhibidor de las NOS-1, NOS-2 y NOS-3 y con indometacina como inhibidor de las COX-1 y COX-2, y estudios de histología e inmunolocalización de la NOS-2 en el riñón.

Resultados. Se encontraron diferencias entre animales hipertensos (SHR) y normotensos (WKY) en condiciones control, además de observarse un bloqueo en la respuesta contráctil al inhibir las NOS y COX. Así mismo, se encontraron dos estadios durante el desarrollo de la HTAS: en las SHR de tres meses existe una hiperreactividad, mientras que en las SHR de seis meses se presenta una hiporreactividad.

Nitric oxide and prostaglandins in endothelial regulation of the contractile tone of hypertensive rats.

SUMMARY

Background. Although the essential hypertension (EHTS) it is a problem of public health and that a great number of publications related with the topic, the etiology of the same one is still ignored. The imbalance between different vasoconstrictors and vasodilatations bioactive factors has been proposed as the aspect essential physiopathology of the hypertension besides that the oxidative stress and the shear stress play a basic role.

Objective. In this work they met differences in the renal vascular reactivity with stimulation (α_1 -adrenoceptors with phenylephrine) when comparing curved concentration-response among the WKY (rats with normal blood pressure) with the SHR (rats with spontaneously high blood pressure) in the ages of three and six months.

Method. We used isolated perfused kidney model in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto Yokamoto rats. The response-concentration curves to make with L-NAME and indomethacin in buffer Krebs. Morphology studies in kidney slices with H & E and immunohistochemistry to NOS-2.

Results. A blockade was observed in the contractile response when inhibiting those enzymatic activity of NOS and COX, suggesting that contractile prostanoids as the PGH_2 and the TXA_2 participate during the contractile response to phenylephrine.

* Graduado de la Maestría en Ciencias Biomédicas con especialización en Farmacología de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Profesor Titular. Doctor en Ciencias en Farmacología y Toxicología. Tutor y Asesor principal de la Tesis de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. *** Médico Cirujano. Maestro en Ciencias. Profesor de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. **** Maestro en Ciencias. Jefe del Departamento Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar. ***** Maestro en Ciencias. Coordinador de Investigación del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ***** Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas y Subdirector de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ***** Doctor en Ciencias y Profesor Titular de Carrera y Coordinador de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Correspondencia:

Dr. Maximiliano Ibarra-Barajas

Cerrada de Palomas S/N esquina con Periférico, Escuela Médico Militar, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la EMGS. Torre de Laboratorios 2o. Piso. Col. Lomas de San Isidro. Del. Miguel Hidalgo. C.P. 11200. Tel.: 5623-1290.

Correo electrónico: maxibarrab@correo.unam.mx y sosalunamc@mexico.com

Recibido: Diciembre 10, 2004.

Aceptado: Enero 17, 2005.

Conclusiones. Estos hallazgos sugieren que prostanoides contráctiles como el PGH_2 y el TXA_2 participan durante la respuesta contráctil. El estrés oxidativo puede favorecer que la actividad de las NOS forme peroxinitritos que condicionan una disminución en la biodisponibilidad de prostanoides vasodilatadores, coadyuvando al daño tubular y glomerular. La reactividad vascular en las SHR de seis meses puede condicionar el disparo de otros mecanismos compensadores que incrementen la PA de forma sistémica para aumentar la presión de perfusión y esta fisiopatología favorece a la HTAS.

Palabras clave: endotelio, óxido nítrico, prostaglandinas, SHR, riñón, prostaciclina, tromboxano, hipertensión, receptores α -1 adrenérgicos, reactividad vascular.

Introducción

La hipertensión arterial es un problema de salud pública y se define según la Organización Mundial de la Salud (WHO) como una presión igual o mayor a 140/90 mm Hg (*Cuadro 1*).^{1,2} Desde el punto de vista biomédico la HTA es un desorden hemodinámico que refleja la alteración en las resistencias vasculares periféricas (RVP). En todas las formas de HTA las RVP totales están aumentadas por múltiples factores, entre los que se incluyen: la disfunción endotelial, que se caracteriza por una disminución de la función y/o la producción de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y prostaciclina (PGI_2), la elevación de los niveles plasmáticos de endotelina, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y aumento de la angiotensina II (AGT-II) circulante como mediador de la vasoconstricción, el incremento de catecolaminas y la viscosidad sanguínea, así como cambios estructurales de los vasos sanguíneos que consisten en la hipertrofia de la pared vascular y contribuyen a la disminución en el número y calibre de las arteriolas.^{3,4} 90% de los pacientes con diagnóstico de HTA son clasificados como hipertensión esencial (HTAS), es decir, no presentan alteraciones secundarias como la estenosis de las arterias renales, la coartación de la aorta, el feocromocitoma, etcétera.⁵⁻⁷

Antecedentes

La rata Wistar cuenta con una cepa espontáneamente hipertensa (SHR) y un control normotenso Wistar Kyoto-Yokamoto (WKY); ambas cepas han sido ampliamente aceptadas como modelo experimental más aproximado a la hipertensión arterial esencial de los humanos, por lo que resulta ideal para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de este tipo de hipertensión primaria. A los tres meses de edad las SHR (SHR_3) presentan hipertensión esencial evidente y a los seis meses de edad (SHR_6) la hipertensión ya se ha desarrollado y las lesiones a órganos blancos se hacen más manifiestas.⁸

El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) se sintetiza en diversas células, además de las endoteliales a partir del aminoácido L-arginina por tres isoformas de la NOS, que son enzimas citosólicas (*Cuadro 2*) con genes diferentes, dos dependientes de

Conclusion. They were also two steps during the development of the HTAS in the SHR of three months a hyperactivity conditioned by a decrease in the biodisponibility of the nitric oxide that increases the generation of TXA_2 and a decrease in the basal generation of PGI_2 exists. However the stimulation α -1 adrenoceptors shows hyporeactivity in SHR six months old. This decrease in the contraction can condition to shot of other feed back mechanisms that the systemic blood pressure in way increases sistematically to increase the perfusion pressure and this physiopathology favors that essential hypertension.

Key words: Endothelium, nitric oxide, prostaglandines, SHR, kidney, prostacyclin, thromboxane, hypertension, adrenergic, α -1 receptors, vascular reactivity.

Ca^{2+} /calmodulina y una inducida por citocinas con propiedades farmacológicas similares al FRDE.⁹ El $\text{NO}\cdot$ controla el tono vascular dependiente del endotelio^{10,11} y desempeña una función activa en numerosos procesos biológicos como la vasodilatación¹²⁻¹⁴ vía NOS-3, la defensa contra infecciones¹⁵ o agresiones ambientales vía NOS-2,¹⁶ la plasticidad de la sinapsis vía NOS-1 y en ser una señal positiva en la activación del sistema inmunológico.¹⁵

La estimulación de receptores endoteliales por neurotransmisores (noradrenalina, acetilcolina, sustancia P y ATP), por autacoides (adenosina, trombina, bradicinina, angiotensina II, histamina, serotonina y endotelina) o por hormonas (insulina, oxitocina, vasopresina y estrógenos) produce la liberación de $\text{NO}\cdot$.¹³ La generación de $\text{NO}\cdot$ también es incrementada por factores físicos como el flujo sanguíneo (estrés de cizallamiento)¹⁴ o la contracción de los vasos sanguíneos,¹⁷ de esta manera el $\text{NO}\cdot$ tiene una función destacada en la regulación del tono del músculo liso vascular y del flujo sanguíneo hacia los tejidos. Además, de su efecto relajante directo el $\text{NO}\cdot$ inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión y migración de células sanguíneas a la pared vascular (*Cuadro 3*).¹⁸

La producción de $\text{NO}\cdot$ por las células endoteliales pueden influir importantemente en la contracción de los vasos sanguíneos, así, la remoción del endotelio de arterias y venas aumenta la sensibilidad del músculo liso vascular a diferentes agentes contráctiles.¹⁹⁻²² La disminución de la contracción en arterias con endotelio se ha atribuido a la liberación del $\text{NO}\cdot$, ya que la inhibición de su síntesis imita los efectos de la remoción del endotelio.²³⁻²⁶

Cuadro 1. Criterios clínicos para el diagnóstico de la HTA.

	Definida por la WHO	mm Hg
Valores normales	Sistólica	139 o menos
	Diastólica	88.9 o menos
Valores límite	Sistólica	140-159
	Diastólica	90-94
Hipertensión	Sistólica	160 o más
	Diastólica	95 o más

Cuadro 2. Isoformas de las sintasas de óxido nítrico.

Abreviatura:	NOS-1 o nNOS	NOS-2 o iNOS	NOS-3 o eNOS
Tejido:	Neuronas y células epiteliales	Macrófagos células del músculo liso	Células endoteliales
Tipo de expresión:	Constitutiva	Inducción transcripcional	Constitutiva
Peso molecular	150 a 160 kDa	125 a 135 kDa	133 kDa
Cromosoma.	12	17	7
Requerimientos de calcio:	Sí	No	Sí
Producción de NO:	NM	mM	nM
Secuencias de primers para RT-PCR	5'GAACCCCAAGACCATCC3' 3' GGCTTTGCTCCACAGTT5' Tamaño bp 308	5'GTGTTCCACCAGGAGATGTTG3' 3'CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC5' Tamaño bp 570	5'TACGGAGCAGCAAATCCAC3' 3'CAGGCTGCAGTCGTTTGATC5' Tamaño bp 819

Cuadro 3. Balance homeostático a nivel del endotelio vascular.

Función	Vasodilatadores	Vasoconstrictores
Tono vascular	Óxido nítrico. Prostaciclina PGI ₂ EDHF Adenosina Bradicinina	Endotelina-1 EDCF Angiotensina II PGH ₂ TXA ₂
Antiagregación plaquetaria	Óxido nítrico PGI ₂ ADPasas Heparán sulfato	TXA ₂
Coagulación	Trombomodulina EPCR Heparán sulfato Dermatán sulfato	Factor Von Willebrand
Fibrinólisis	PAI-1 Óxido nítrico	t-PA Endotelina-1
Crecimiento celular	PGI ₂ Heparán sulfato	PDGF Angiotensina II Moléculas de adhesión

Existe considerable evidencia indicando que la hipertensión arterial y el envejecimiento se asocian con una reducción en la capacidad del endotelio para deprimir la contracción de los agonistas α_1 -adrenérgicos, la serotonina y la endotelina-1 en arterias de la rata.²⁷⁻³⁰ Sin embargo, la información sobre los mecanismos involucrados en este fenómeno es controversial. Se ha propuesto que en arterias de animales viejos o hipertensos, la producción de NO por el endotelio está reducida.³¹⁻³⁶

Las prostaglandinas (PGS) y tromboxano A₂ (TXA₂) tienen efectos importantes sobre cuatro tipos de músculo liso: vías respiratorias, aparato gastrointestinal, reproductor y vascular. Otros blancos importantes son las plaquetas y los monocitos, el sistema nervioso central, terminales nerviosas presinápticas y sensoriales, órganos endocrinos, tejido adiposo y los ojos.³⁷⁻⁴⁰

A nivel vascular, el TXA₂ es un mitógeno en la célula muscular lisa y es el único eicosanoide que ha mostrado te-

ner este efecto de manera convincente. El efecto mitogénico es potenciado al exponer a las células musculares lisas en la testosterona, la cual produce regulación interna de los receptores de TXA₂ en dichas células; además de este efecto, también produce vasoconstricción. La prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) también es vasoconstrictora, pero no tiene efecto mitogénico en las células musculares lisas. Otro vasoconstrictor potente es el 8-*epi*-PGF₂ α . Esta sustancia se produce en grandes cantidades en el hígado de los cirróticos y se piensa que está involucrada en el síndrome hepatorenal.

Las prostaglandinas vasodilatadoras (PGI₂) y (PGE₂) promueven esta acción al disminuir el calcio intracelular del músculo liso. La prostaciclina (PGI₂) vascular es sintetizada por el endotelio y el músculo liso, siendo estas últimas las principales contribuyentes. La PGI₂ tiene un metabolismo rápido, de manera que en cuestión de segundos es convertida en productos más estables, pero inactivos. La PGE₂ es otro producto vasodilatador endotelial que se encuentra en la microcirculación y además tiene importantes efectos biológicos en el aparato tubular renal en la diuresis de Na⁺.⁴¹

Tanto la médula como la corteza renal sintetizan prostaglandinas, pero en la médula en mayor cantidad (*Figura 1*).⁴² En ambos sitios también se producen varios ácidos hidroxieicosatetranoicos, leucotrienos, productos de la P450 y epóxidos. Estos compuestos tienen importantes funciones autorreguladoras en el riñón. Las PGS regulan el tono vascular y la homeostasis del agua y sales en los riñones de los mamíferos y se encuentran involucrados en la mediación y modulación de las acciones hormonales. De esta forma las PGS tienen la capacidad de modificar la hemodinámica renal, así como las funciones glomerular y tubular. Esta importante regulación se hace evidente al emplear inhibidores de la COX (AINES) en pacientes ancianos y en enfermos renales.⁴³

Los principales productos eicosanoides de la corteza renal son la PGE₂ y la PGI₂. Ambas aumentan la liberación de renina; sin embargo, por lo general la liberación de este péptido está bajo el control más directo de los receptores β_1 -adrenérgicos. El glomérulo también sintetiza pequeñas cantidades de TXA₂. Este potente vasoconstrictor no parece ser

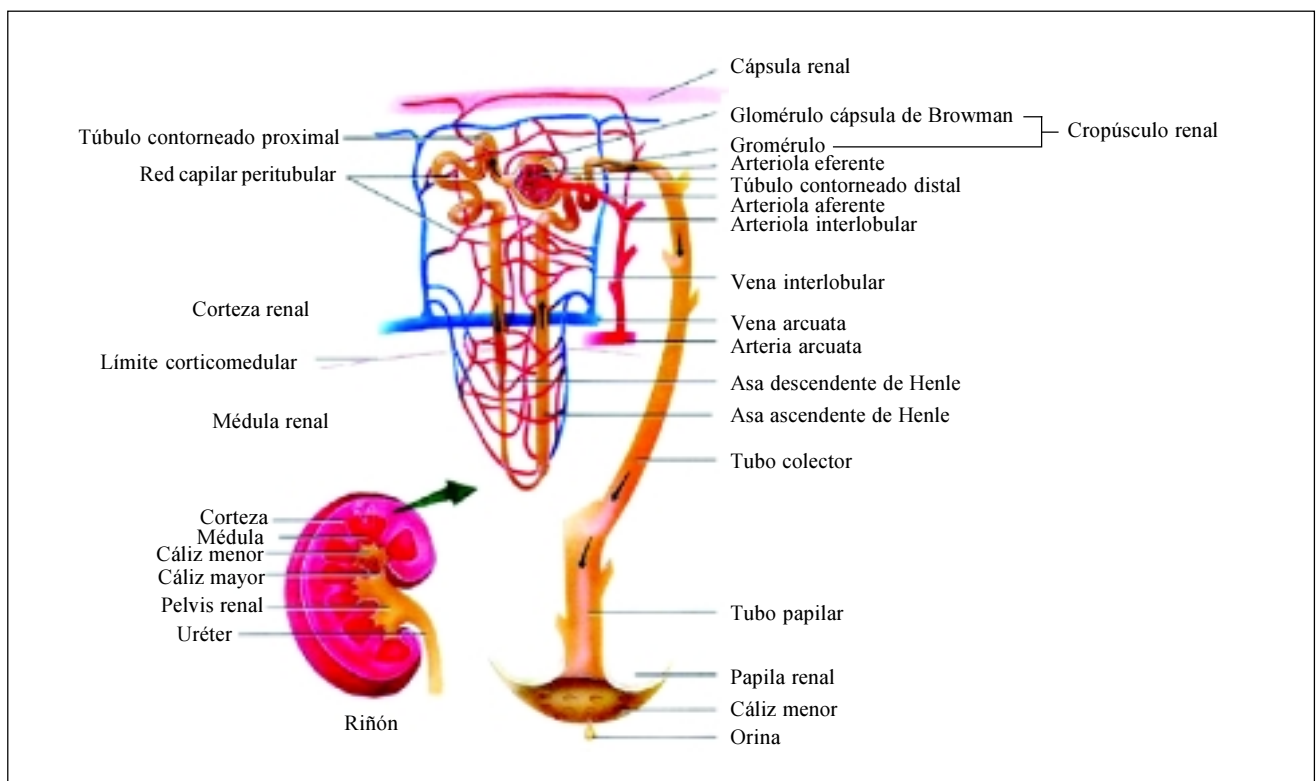


Figura 1. Muestra las diversas estructuras anatómicas del riñón que conforman la unidad funcional y anatómica llamada nefrona. En la esquina inferior izquierda se muestra una sección longitudinal del riñón, que básicamente tiene dos zonas de afuera hacia su centro. La más externa y conocida es la corteza renal, en donde se encuentra la mayoría de los vasos sanguíneos: la arteria arcuata que disminuye de calibre para conformar las arteriolas interlobulares hasta llegar a las arteriolas aferentes del glomérulo; de ahí el plasma sanguíneo es ultrafiltrado pasando al espacio de Bowman, donde es recolectado por el túbulo contorneado proximal con importantes funciones en la reabsorción de proteínas; de ahí el ultrafiltrado recorre a través del Asa de Henle pasando de la zona cortical a la zona medular, donde se intercambian diversos iones principalmente; de ahí regresa a la zona cortical hasta el túbulo contorneado distal para ser excretado por los tubos colectores, que van formando la orina, la cual es conducida hasta los cálices y pelvis renal para llegar a los uréteres y la vejiga. La zona medular es irrigada por una rama de la arteriola eferente (continuación de los vasos que conforman el glomérulo); a partir de la arteriola eferente se derivan múltiples ramificaciones conocidas como la *red capilar peritubular* que llevan los nutrientes y el O_2 hasta las células tubulares; para llegar a la zona medular esta red capilar peritubular desprende los *vasa recta* que tienen una trayectoria larga hasta el Asa de Henle.

responsable de la regulación de la función glomerular en sujetos sanos.⁴⁴

La PGE_1 , la PGE_2 y la PGI_2 incrementan la filtración glomerular a través de sus efectos vasodilatadores. Estas prostaglandinas también aumentan la excreción de agua y sodio, el caso de la primera es un resultado probable de una disminución de la acción de la hormona antidiurética o de la adenilciclase. Es todavía desconocido si el efecto natriurético es producido por la inhibición directa de la reabsorción de sodio en el túbulo distal o si se debe a un incremento del flujo sanguíneo en la médula renal. Los diuréticos de asa, por ejemplo, la furosemina, producen su efecto en parte por estimulación de la actividad de la COX, lo cual incrementa la síntesis de prostaglandinas vasodilatadoras en el riñón normal. Por eso la respuesta del paciente a los diuréticos de asa se verá disminuida por la administración concomitante de un AINE (Figura 2).⁴⁵

Así como la hormona antidiurética, el TXA_2 parece incrementar el transporte de agua en la vejiga del sapo; éste y otros datos sugieren que el efecto de la hormona antidiurética

(ADH) ejerce parte de su efecto al incrementar la síntesis del TXA_2 . Sin embargo, en presencia de infiltración de células inflamatorias como en las glomerulonefritis o en el rechazo de trasplante renal, estas células, monocitos y macrófagos liberan cantidades sustanciales de TXA_2 . Esta concentración aumentada produce constricción intrarrenal (tal vez un efecto del tipo ADH), resultando en una disminución de la función renal; de manera teórica, ésta se podría mejorar con inhibidores de la sintasa de TXA_2 o de antagonistas de su receptor, desafortunadamente hasta el momento ninguno de estos fármacos está disponible para su uso clínico.

Teóricamente el incremento del TXA_2 y la disminución de la PGE_2 y la PGI_2 pueden estar involucrados en el desarrollo de la HTA, motivo de este trabajo de investigación. Estos cambios hipotéticos presentan otro problema si son primarios o secundarios. En la nefrotoxicidad por ciclosporina se encontró formación de TXA_2 ; sin embargo, no se ha determinado relación de causalidad.⁴⁶

En el riñón, la inhibición aguda o crónica de la síntesis del NO produce vasoconstricción arteriolar y retención de

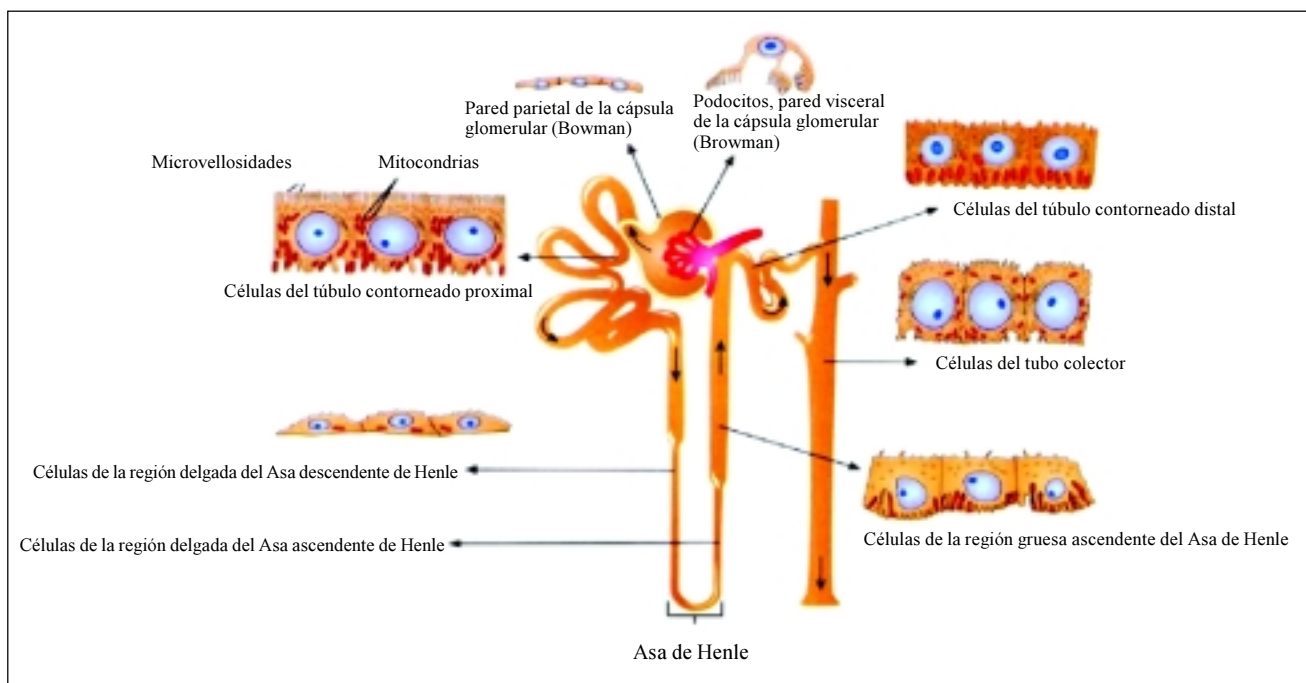


Figura 2. Se muestran detalles de la morfología de las células que forman el aparato tubular de la nefrona y el trayecto del ultrafiltrado glomerular. Las células de los túbulos contorneados proximales presentan microvellosidades que se encuentran en la región de la luz del túbulo en contacto con el ultrafiltrado glomerular; estos incrementos de la superficie permiten un mayor intercambio de sustancias entre la luz tubular y la red capilar peritubular, en esta región son reabsorbidas de manera normal las proteínas que han escapado a la barrera glomerular y son devueltas a la circulación por transporte activo a través de endocitosis y vacuolización, ya que estos procesos que dependen de energía cuentan con múltiples mitocondrias. El asa de Henle presenta células aplanadas en su región delgada, pero cuando asciende las células se tornan cuboides con pocas microvellosidades. Las células del túbulo contorneado distal muestran núcleos celulares con nucléolos más grandes y con menos microvellosidades. Finalmente, las células de los tubos colectores son cilíndricas con núcleos grandes y con pocas microvellosidades.

sodio y agua, así la deficiencia de $\text{NO}^\cdot$ está relacionada con una disminución del flujo sanguíneo renal y una eliminación anormal de agua y sodio, contribuyendo de esta manera al desarrollo de la hipertensión arterial.^{47,48} Por otro lado, se ha descrito que durante el daño renal hay una mayor producción de prostaglandinas que contribuye a la alteración de la función renal.^{49,50}

Es probable que durante el desarrollo de la HTAS existan alteraciones en la función del tono vascular, sobre todo a nivel renal y que se encuentran involucradas con cambios en la estructura de los vasos sanguíneos (hipertrofia del músculo liso vascular), así como con una mala regulación de las interacciones del endotelio con las células sanguíneas, lo cual puede guiar a lesiones vasculares severas, trombosis y alteración de la función renal de forma permanente (insuficiencia renal crónica).⁵¹⁻⁵⁴ Por lo tanto, el estudio de los factores que modulan la actividad contráctil de la vasculatura renal a la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos, puede aportar información importante que nos permitirá conocer mejor los mecanismos que participan en el desarrollo de las complicaciones vasculares durante la hipertensión arterial o el envejecimiento, así como permitir el diseño de nuevas estrategias farmacológicas para su tratamiento.^{55,56}

Un aspecto particularmente interesante es que las modificaciones en la actividad de estos mediadores químicos se

han relacionado con hiperreactividad de las arterias de conductancia y de resistencia a los agentes vasoconstrictores,⁶⁰ en donde, además, se pueden encontrar involucrados los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (*Cuadro 4 y 5*), en particular el α_{1D} -adrenérgico^{69,70} y con el desarrollo de complicaciones cardiovasculares como el accidente vascular cerebral, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad isquémica coronaria y la aterosclerosis. Sin embargo, existe controversia sobre los mecanismos involucrados en la disfunción endotelial durante la hipertensión y el envejecimiento.

Material y métodos

En esta línea de investigación nosotros evaluamos de forma inicial la participación del $\text{NO}^\cdot$ y de las prostaglandinas (*Figura 3*) en la vasoconstricción a la fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico) en la vasculatura renal de ratas normotensas (WKY_3 y WKY_6) e hipertensas (SHR_3 y SHR_6). Para alcanzar este objetivo se utilizaron varias estrategias experimentales:

1. Estudios funcionales para determinar el efecto de inhibidores de la síntesis de $\text{NO}^\cdot$ (L-NAME), de las prostaglandinas (indometacina) sobre la contracción inducida por la fenilefrina (FE) en la vasculatura renal tanto de ratas normotensas (WKY) como hipertensas (SHR) con tres y seis meses de edad.

Cuadro 4. Diferentes características de los subtipos del receptor α_1 -adrenérgico.

Nomenclatura	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Nombres previos	α_{1a} , α_{1c}		
Proteínas G	Gq/11	Gq/11	Gq/11
Potencia	NE $\geq$ Epi	Epi = NE	Epi = NE
Agonista selectivos	A61603		
Antagonista selectivos	KMD3213 Niglutidipina 5-metiluradipil	AH11110A	BMY7378
Número de aminoácidos	466	519	572
Gene	ADRA1C	ADAR1B	ADAR1D
Cromosoma	8	5	20

Cuadro 5. Funciones afectadas al bloquear el gen específico de los diferentes subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en modelos de ratón genéticamente modificados.

Carente del receptor:	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Knockout Corazón	Contracción ↓	→	
Contractibilidad→ aórtica	↓	↓	
Respuesta Presora	FE↓	FE/NE↓	FE/NE↓
SNC	N/D	Actividad↓	Dolor↓
			Aprendizaje↓

FE = fenilefrina. NE = noradrenalina. SNC = sistema nervioso central.

2. Estudios morfológicos para evaluar alteraciones en la histología de los riñones empleados en los experimentos.

Registro de la presión de perfusión renal en riñón aislado de las ratas WKY y SHR

Todos los animales fueron pesados para calcular la dosis de pentobarbital sódico, empleando una dosis de 60 mg por kilogramo de peso; se administró por vía intraperitoneal con una jeringa y aguja para tuberculina (1 mL) a nivel del epigastrio. Se realizó una laparotomía, incidiendo plano por plano hasta llegar a peritoneo y exponer el riñón derecho. Se descapsuló el riñón para eliminar las glándulas suprarrenales y el posible efecto de las hormonas liberadas por ellas.

Posteriormente se disecaron las arterias mesentérica superior, renal derecha y aorta abdominal, y mediante cuatro suturas se refirió un tramo vascular en cruz; la primera y la

segunda suturas se colocaron en la aorta abdominal por arriba y por abajo de la arteria mesentérica y de la arteria renal, respectivamente, la tercera en la arteria renal, la cual sirvió para sujetar el catéter y la última en la arteria mesentérica proximal a la aorta (*Figura 4-A*).

Se empleó un catéter marca Johnson-Johnson Número 24 G*, con un diámetro de 0.70 mm, una capacidad de flujo máximo de 24 mL/min y una longitud de 19 mm; el mandril (guía metálica) fue limado previamente para quitar los filos.

Se introdujo la punta del catéter por la arteria mesentérica superior y siguió el trayecto hasta alcanzar la arteria renal. Se ligó a nivel de la arteria renal y a nivel de la arteria mesentérica con el mandril metálico puesto, se introducen 4 mL de solución Krebs oxigenada previamente por el burbujeo con carbógeno y suavemente con una jeringa de 1 mL (tipo insulina). Se extrajo el riñón, el cual se colocó en el dispositivo para órgano aislado perfundido.

Para medir la presión de perfusión renal se empleó el modelo de órgano aislado perfundido, en donde se emplea un aparato que integra un circuito con dos bombas y dos líquidos circulantes. El exterior es agua destilada a 37 °C, que tiene como objeto controlar y conservar la temperatura en condiciones fisiológicas. El segundo lleva un amortiguador de Krebs con un pH 7.4 y oxígeno que semeja las condiciones fisiológicas de la sangre (*Figura 4-B*).

En el matraz de bola con capacidad de dos litros, que cuenta con una doble cámara, se deposita la solución Krebs, cuya composición (en mM) es la siguiente: NaCl, 118; NaHCO₃, 25; KCl, 4.7; MgSO₄·7H₂O, 2.5; KH₂PO₄, 1.17; glucosa, 11.6 y EDTA, 0.026. La solución Krebs permaneció en burbujeo constante de una mezcla de 95/5% de O₂/CO₂, a un Ph de 7.4 y a una temperatura de 37 °C. El Krebs fluye a

* Durante la estandarización se realizaron experimentos con un catéter metálico observando un ruido = 40 mm Hg. La resistencia producida por el catéter de plástico a un flujo de 7.4 ± 0.88 mm Hg es de 0.4 ± mm Hg, no ocasiona ruido.

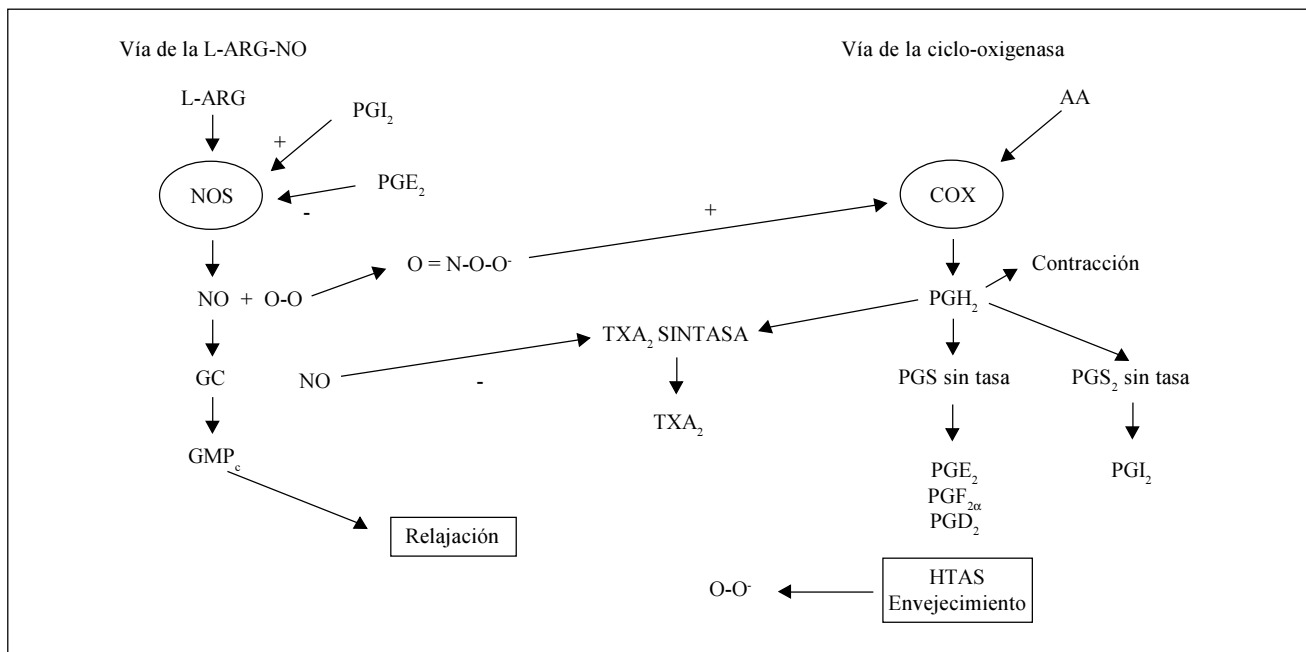


Figura 3. Hipótesis: presentamos las dos vías metabólicas y los posibles mecanismos involucrados en la participación del óxido nítrico y las prostaglandinas durante el desarrollo de la hipertensión esencial (HTAS). Durante el desarrollo de la hipertensión existe una menor biodisponibilidad del óxido nítrico por la reacción de las ROS que aumentan conforme avanza la edad, en donde puede encontrarse una expresión aumentada de las NOS, con una potenciación de la producción de PGS contráctiles, probablemente por la inducción de la COX-2 que es dependiente del óxido nítrico, de tal manera que las respuestas contráctiles a la estimulación α_1 -adrenérgica en la vasculatura renal se verían afectadas al inhibir las NOS con L-NAME y las COX con indometacina, por lo que es muy probable que las respuestas a la estimulación α_1 -adrenérgica sean diferentes, significativamente al comparar los grupos de ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) y es posible que, además, existan diferencias entre las edades (envejecimiento) por la acción acumulativa del estrés oxidativo (Di Yang 2002).

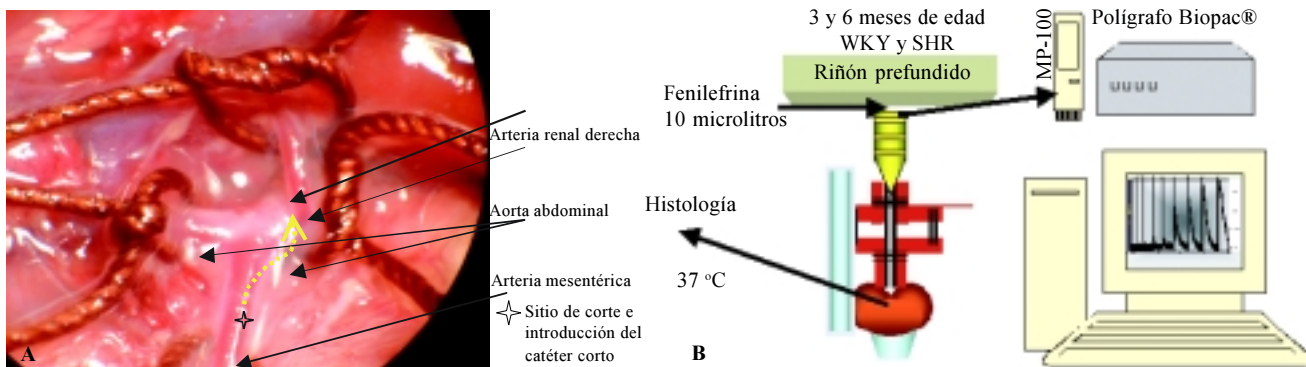


Figura 4 A y B. Se muestra una fotografía de la disección y aislamiento del riñón derecho y sitio de canalización, así como la presentación de un esquema de la metodología empleada para montar el riñón derecho en el aparato de órgano aislado durante los experimentos de estimulación con fenilefrina y recolección del riñón para histología terminado el experimento.

través de una bomba peristáltica para perfusión hasta una serpentina de doble cámara, donde de nueva cuenta es recalentado para asegurar la temperatura de 37 °C, de ahí el Krebs fluye hasta un tubo en "T" donde un extremo desemboca en el sensor de presión acoplado a un transductor MP100 del polígrafo computarizado (Biopac System Inc., CA, USA) y a una computadora, permitieron medir los cambios en la presión de perfusión renal a un flujo constante de 7.5 mL/min. En el otro extremo se conecta con el catéter donde se monta el riñón aislado. Además existe una cámara por donde fluye agua a 37

°C para calentar el riñón durante el experimento y permite la recolección de las muestras de perfundido, recolectando a un flujo constante durante 10 segundos 1000 µL en un tubo nuevo, el cual es separado y dividido en dos tubos nuevos de 500 µL, los cuales se etiquetan y almacenan a -80 °C.

Para controlar el efecto de la activación inespecífica de la fenilefrina (FE) a los receptores β_1 -adrenérgicos y β_2 -adrenérgicos, siempre se adicionó a todas las soluciones amortiguadoras de Krebs Propanolol [1×10^{-7}]. Y para bloquear el efecto α_2 -adrenérgicos se agregó Rauwalscina [1×10^{-7}]. Para

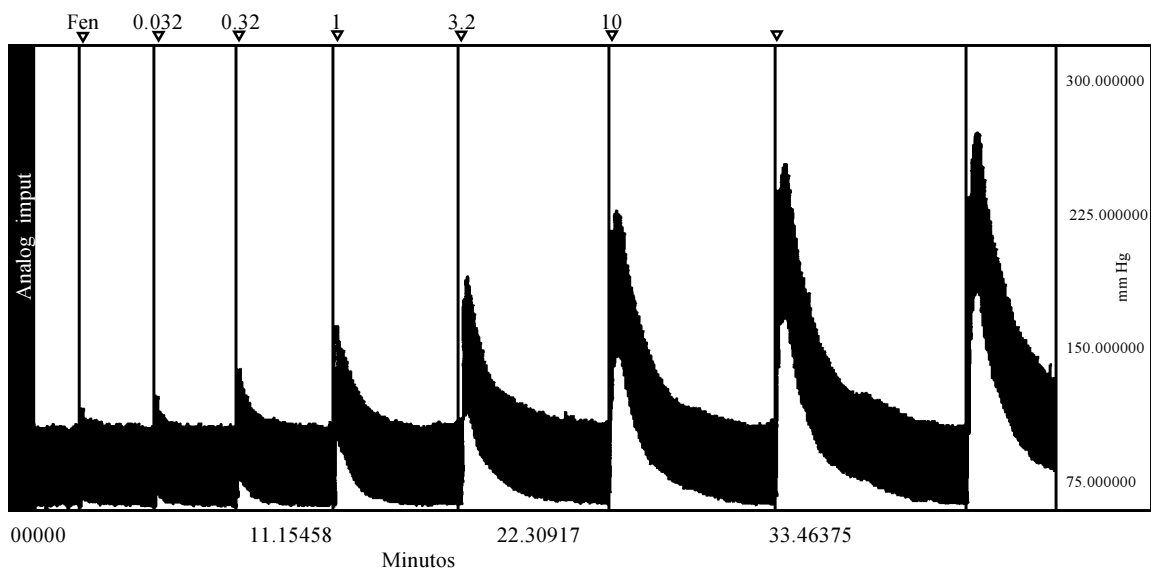


Figura 5. Registro de un experimento representativo para evaluar la respuesta con la fenilefrina en la vasculatura renal en la normotensión (WKY de tres meses de edad).

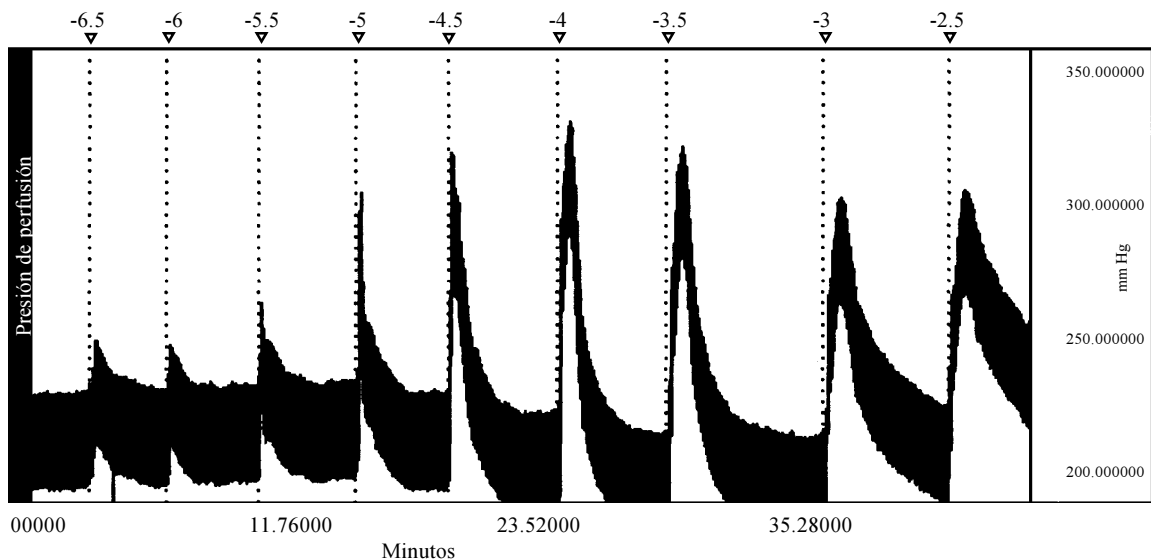


Figura 6. Registro de un experimento representativo para evaluar la respuesta con la fenilefrina en la vasculatura renal en la HTAS (SHR de tres meses de edad).

tal efecto se agregaron 200 μL de una solución de cada uno de ellos de $[1 \times 10^{-3}]$ Molar en 2000 mL de Krebs.

Protocolos experimentales

Con el propósito de determinar la reactividad vascular renal y el efecto presor a la estimulación α_1 -adrenérgica, se realizaron curvas concentración-respuesta con volúmenes de 10 μL con fenilefrina (FE), en el siguiente rango de concentraciones (en nanomoles): [0.032], [0.1], [0.32], [1.0], [3.2], [10.0], [32.0] y [100.0].

Protocolo I. Para determinar la participación del óxido nítrico y las prostaglandinas se realizaron experimentos control, estabilizando durante 60 minutos y luego apagando 30 segun-

dos la bomba para cambiar el Krebs con el inhibidor de la enzima específica. En este protocolo la solución sería el Krebs sin ninguno de los dos inhibidores empleados (L-NAME o indometacina). Se encendía la bomba de perfusión después de 30 minutos en los que se deja que el inhibidor haga su efecto y se realiza la curva concentración-respuesta a la fenilefrina. En las *figuras 5 y 6* se muestran registros representativos de este protocolo.

Protocolo II. Para determinar la participación del óxido nítrico se realizaron experimentos con L-NAME $[1 \times 10^{-6}]$ M; inhibidor no selectivo de las NOS. Primero se estabilizó durante 60 minutos y luego se apagó 30 segundos la bomba para cambiar el Krebs con el L-NAME. En este protocolo la

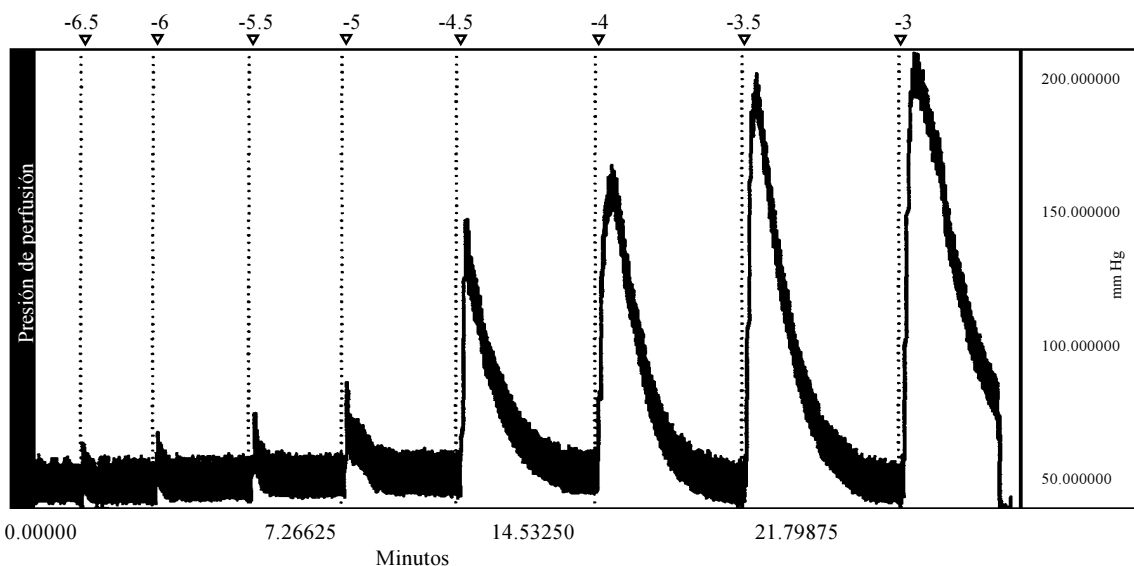


Figura 7. Registro de un experimento para evaluar la respuesta con la fenilefrina en la vasculatura renal en la normotensión (WKY de tres meses de edad) en presencia de L-NAME [1×10^{-6}] M.

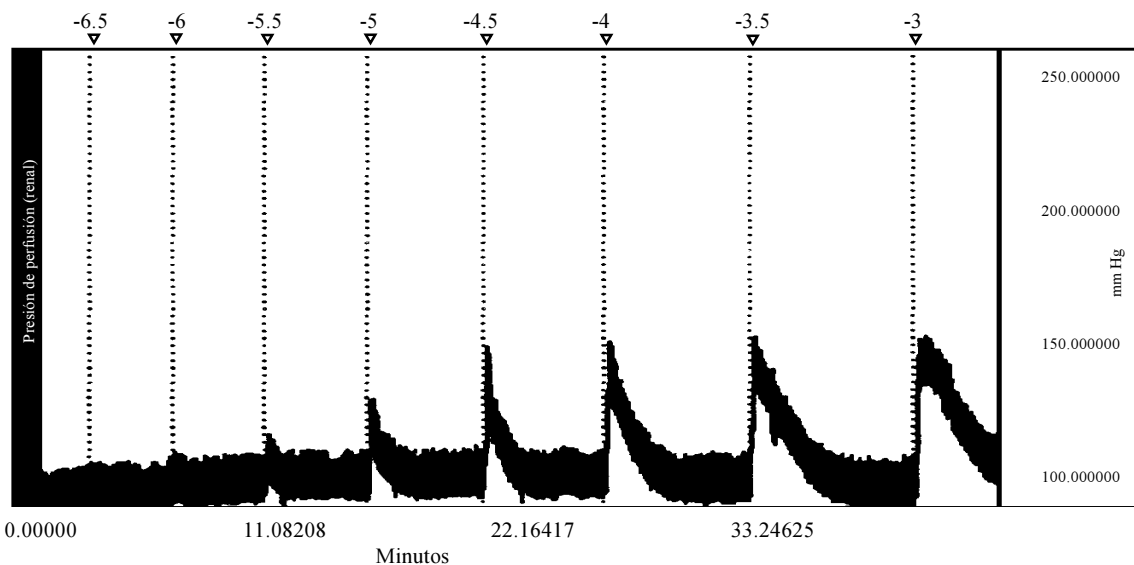


Figura 8. Registro de un experimento para evaluar la respuesta a la fenilefrina en la vasculatura renal en la HTAS (SHR de tres meses de edad) en presencia de L-NAME [1×10^{-6}] M.

segunda solución de 2000 mL de Krebs contiene 200 μ L de una solución de L-NAME a una concentración de 1×10^{-2} Molar. Se encendía la bomba de perfusión después de 30 minutos en los que se había dejado que el inhibidor hiciera su efecto y se realizara la curva concentración-respuesta a la fenilefrina. En las *figuras 7 y 8* se muestran registros representativos de este protocolo.

Protocolo III. Para determinar la participación de las prostaglandinas se realizaron experimentos con indometacina [1×10^{-5}] M, inhibidor no selectivo de las COX. Primero se estabilizó durante 60 minutos y luego se apagó 30 segundos la bomba para cambiar el Krebs con indometacina. En este protocolo la segunda solución de 2,000 mL de Krebs se

adicionó indometacina, de manera que 2,000 μ L de una solución de indometacina a una concentración de 1×10^{-2} Molar se agrega una solución de NaHCO_3 (4.2 g disueltos en bicarbonato de sodio con 200 mL de agua ultra pura); posteriormente esta solución se adiciona con el resto de la solución de Krebs, que no contiene su parte proporcional de bicarbonato de sodio. Se encendía la bomba de perfusión después de 30 minutos en los que se había dejado que el inhibidor hiciera su efecto y se realizaron las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina. En las *figuras 9 y 10* se muestran registros representativos de este protocolo.

Al terminar de realizar los experimentos de órgano aislado perfundido, con sus curvas de concentración-respuesta, se to-

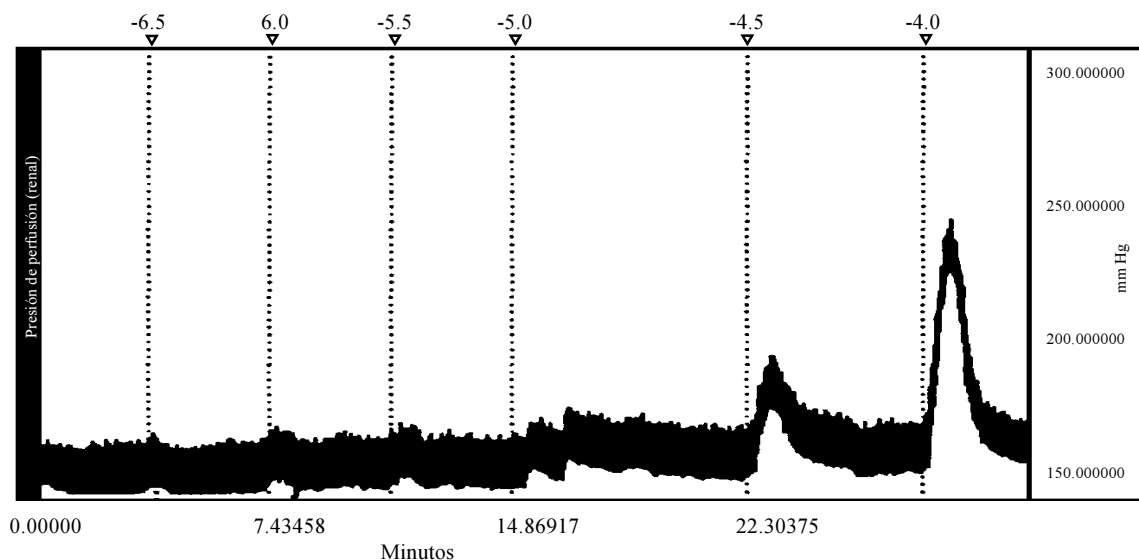


Figura 9. Registro de un experimento para evaluar la respuesta a la fenilefrina a la vasculatura renal en la normotensión (WKY de tres meses de edad) en presencia de indometacina [1×10^{-5}] M.

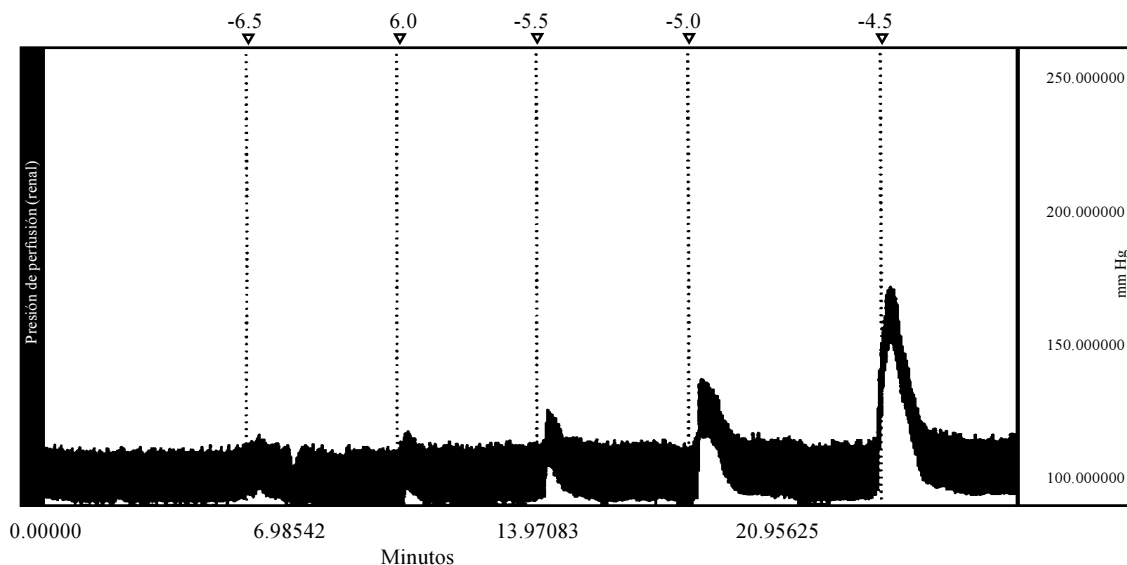


Figura 10. Registro de un experimento para evaluar la respuesta a la fenilefrina a la vasculatura renal en la HTAS (SHR de tres meses de edad) en presencia de indometacina [1×10^{-5}] M.

maron los riñones para pesarse y posteriormente fueron introducidos durante 48 horas en una solución de formol amortiguado a 8% (8 mL de formol diluyendo en 92 mL de PBS).

Morfología e inmunohistoquímica

La deshidratación de los riñones se realizó al introducirlos en baños de etanol a diferentes concentraciones: etanol 70% durante 24 horas, etanol 80% durante dos horas, etanol a 90% durante dos horas, etanol a 100% durante dos horas, alcohol amílico durante dos horas.

La inclusión en parafina se realiza con la parafina 1, incubándola durante dos horas a una temperatura de 74 °C; se saca de esta parafina y se vacía en la parafina 2, incubándola

durante cuatro horas a 74 °C; sacarla y vaciarla en el molde con parafina para inclusión (Paraplast).

Los riñones fijados, deshidratados e incluidos en parafina se cortaron longitudinalmente, con un espesor de tres micras y se colocaron sobre laminillas previamente sialinizadas. Son desparafinadas durante cinco minutos y teñidas con la técnica de H & E* y con tricrómico de Masson.

Para realizar la inmunohistoquímica se empleó el Kit Dako LSAB + system HRP (No. Cat. K0679), laminillas con cortes montados en parafina sin desparafinar. Éstos son marcados con

* Hematoxilina y eosina.

un lápiz de diamante y se señaló la proteína que se desea inmunolocalizar (NOS-2), así como el número de identificación.

Se procedió al desparafinado y recuperación de antígenos, para lo cual se empleó una olla de presión con indicador de presión; se introdujeron las laminillas en depósitos con una solución de BORG decloaker, con un pH de 9.5 No. Cat. 001000MIJ hasta alcanzar una presión entre 20 a 23 ψ durante 10 minutos. Se abrió la olla de presión y eran dejados pasar cinco minutos en agua destilada en una cámara de humedad. Posterior a esto se aplicó con el lápiz de silicón (Vector lab No. Cat. H-4000) una región en la periferia del corte con tejido y se agrega el bloqueador de peroxidasa (Dako Co. No. Cat. K.1395); se dejaron en incubación con agitación oscilatoria en una cámara de humedad durante 10 minutos. Fueron lavados suavemente y se colocaron las laminillas en una solución de PBS y se les aplicó el segun-

do bloqueador de proteínas inespecíficas (Dako Co. No. Cat. X0909), se deja incubar durante 10 minutos con agitación oscilatoria en una cámara de humedad. Se volvieron a lavar suavemente colocando las laminillas en una solución de PBS y se coloca el anticuerpo primario específico que se deseaba estudiar en esa laminilla (anti-NOS-2), un anticuerpo primario por una laminilla.

El anticuerpo primario fue diluido 1:500 de la siguiente; para la NOS-2 se emplearon 5 μ L de anti-NOS-2 con 500 mL de diluyente (Dako. Co. No. Cat. 53022). El anticuerpo primario se dejó incubando 24 horas a 4 °C. Al día siguiente se lavaron las laminillas con TRIS y se aplicó el segundo anticuerpo de unión durante 15 minutos y se volvieron a lavar con TRIS y se agregó el anticuerpo de estreptavidina-peroxidasa; se incubaron durante 15 minutos y se agregó el cromógeno, quedando listas para su revisión.

Estadística

Las curvas concentración-respuesta, dentro de un mismo grupo y entre grupos distintos, se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de dos vías en el programa Sigma Stat. La respuesta máxima (E_{max}) y la concentración efectiva cincuenta (CE_{50}) se calcularon empleando las regresiones no lineales con parámetros farmacodinámicos del programa Winnonlin (*Cuadro 6*). Para los promedios de los resultados de las respuestas con FE, de presión de perfusión renal y de cuantificación de PGS, por tratarse de variables con distribución normal y ser de tipo continuo se utilizó la ANOVA de una vía, prueba “t” y “t” de Student pareada o no pareada dependiendo de si el análisis fue en un mismo grupo, a lo largo de un mismo tratamiento o con diferentes tratamientos, respectivamente.

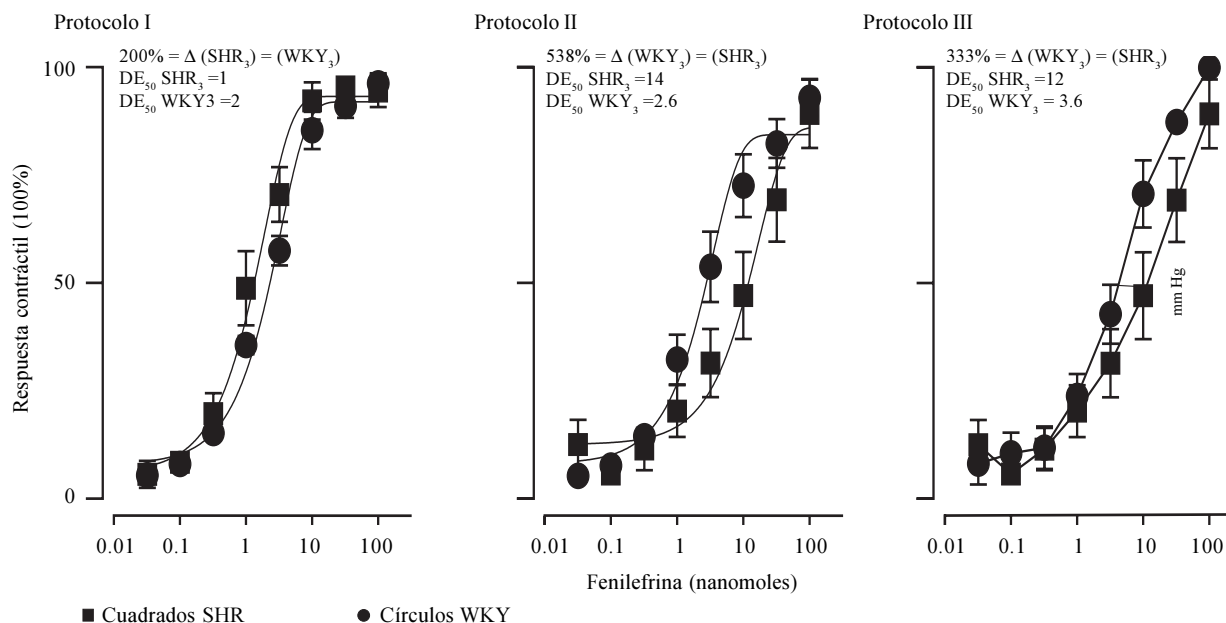
Cuadro 6. Resultados de presión sistólica caudal, peso animal y peso del riñón derecho.

	Presión sistólica (mm Hg)	Peso animal (g)	Peso riñón (g)
WKY			
1 mes	N.D.	88.0 $\pm$ 4.1	N.D.
3 meses	122.0 $\pm$ 2.9	265.5 $\pm$ 11.7	1.35 $\pm$ 0.07
6 meses	114.2 $\pm$ 3.0	402.3 $\pm$ 14.4	1.7 $\pm$ 0.05
SHR			
1 mes	N.D.	64.3 $\pm$ 3.9	N.D.
3 meses	183.0 $\pm$ 6.8	217.9 $\pm$ 9.2	0.985 $\pm$ 0.07
6 meses	203.3 $\pm$ 14.5	300.1 $\pm$ 9.3	1.3 $\pm$ 0.05

Cuadro 7. Resultados de los promedios farmacodinámicos obtenidos de las respuestas (Δ) de la presión de perfusión renal con estimulación α_1 -adrenérgica con dosis logarítmicas de FE.

	E_{max} (mm Hg)	CE_{50} (nmoles de fenilefrina)	Gamma (γ)
WKY ₃			
Control (n = 8)	184.58 $\pm$ 18.91	3.41 $\pm$ 1.02	
L-NAME (n = 8)	187.10 $\pm$ 19.38	66.84 $\pm$ 62.08	1.35 $\pm$ 0.07
Indometacina (n = 8)	157.32 $\pm$ 21.10	63.67 $\pm$ 57.9	1.7 $\pm$ 0.05
SHR ₃			
Control (n = 7)	141.91 $\pm$ 16.91	4.3 $\pm$ 1.13	N.D.
L-NAME (n = 4)	113.79 $\pm$ 22.83	12.84 $\pm$ 9.2	0.985 $\pm$ 0.07
Indometacina (n = 4)	124.52 $\pm$ 28.19	167.37 $\pm$ 110.67	1.3 $\pm$ 0.05
WKY ₆			
Control (n = 7)	254.8 $\pm$ 62.65.91	43.7 $\pm$ 41.38	
L-NAME (n = 4)	272.89 $\pm$ 85.37	251.9 $\pm$ 143.315	1.35 $\pm$ 0.07
Indometacina (n = 5)	103.13 $\pm$ 29.11	108.04 $\pm$ 98.32	1.7 $\pm$ 0.05
SHR ₆			
Control (n = 7)	144.56 $\pm$ 13.12	3.43 $\pm$ 1.02	N.D.
L-NAME (n = 4)	150.3 $\pm$ 19.03	8.44 $\pm$ 4.85	0.985 $\pm$ 0.07
Indometacina (n = 4)	210.46 $\pm$ 27.13	3.77 $\pm$ 1.16	1.3 $\pm$ 0.05

3 meses



6 meses

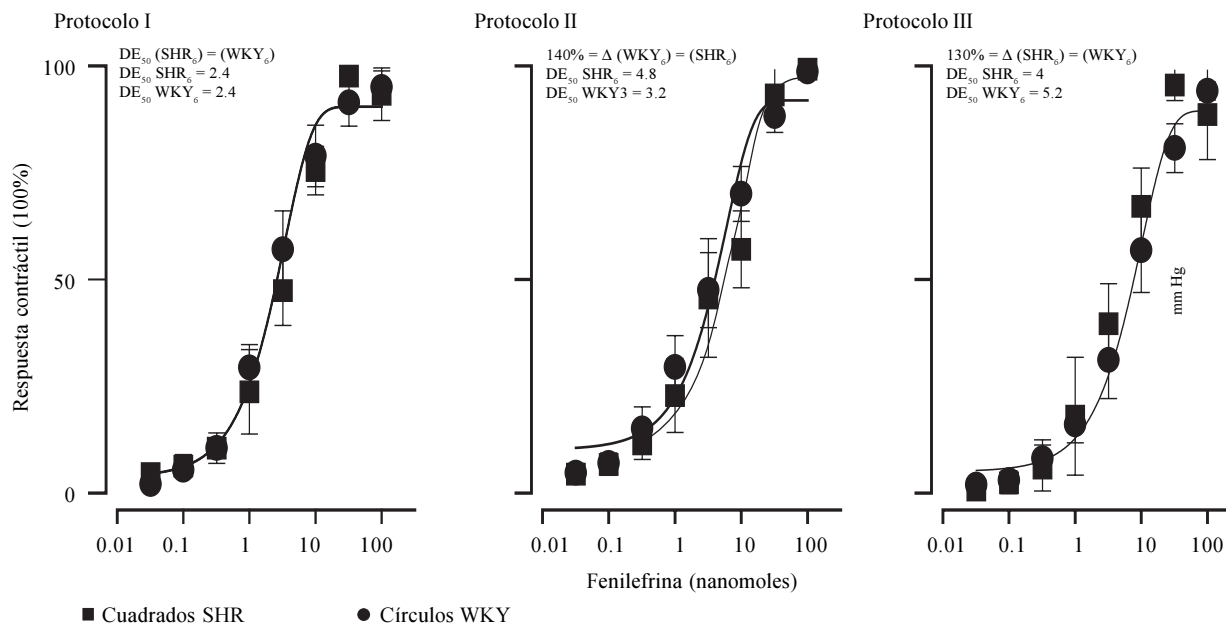


Figura 11. Se muestran las curvas concentración-respuesta en porcentaje a los tres meses; las SHR muestran un desplazamiento a la izquierda (hiperreactividad) en las condiciones control (Protocolo I), cuando se inhibe la síntesis del óxido nítrico las WKY de tres meses tienen un desplazamiento a la izquierda (hiperreactividad) al antagonizar el efecto vasodilatador del óxido nítrico, mientras que en las SHR existe un ligero desplazamiento a la derecha (hiporreactividad). La inhibición de la síntesis de prostaglandinas ocasiona un desplazamiento a la derecha (hiporreactividad), que es mayor en los animales hipertensos (SHR). El envejecimiento condiciona una respuesta similar entre los animales hipertensos y normotensos en el protocolo I y protocolo II, sin embargo, la inhibición de las prostaglandinas en los animales hipertensos de seis meses favorece un desplazamiento a la izquierda mientras que en los normotensos hay una tendencia al desplazamiento hacia la derecha.

En todos los casos se tomó como nivel de significancia estadística una $p < 0.05$. Además se utilizó el programa Sigma Plot para la construcción de las curvas concentración-respuesta (empleando la función de Fit curve con la ecuación de la sigmoide más adecuada para la figura, graficando con los pro-

medios y errores estándar de todos los experimentos) y el programa de hoja de cálculo de Excel para la captura de datos, la regresión lineal de la curva estándar de las mediciones de PGS y para el análisis estadístico descriptivo, cálculo de promedios, desviación estándar, error estándar y porcentajes.⁷¹

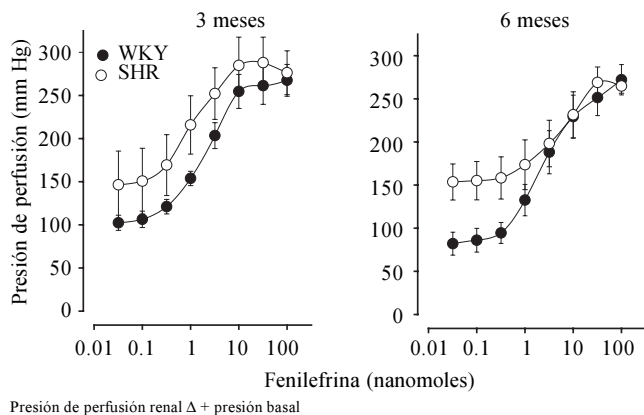


Figura 12. Existen dos etapas en el desarrollo de la hipertensión esencial a los tres meses en las SHR, las cuales tienen un aumento de la reactividad y a los seis meses presentan una disminución de la reactividad vascular renal. Se presentan curvas concentración-respuesta con el porcentaje de la respuesta contráctil a la estimulación del receptor α_1 -adrenérgico con dosis logarítmicas de fenilefrina; con estos puntos se realizó una regresión no lineal para la sigmoide. La figura 5-A presenta la curva de las SHR₃, muestra un desplazamiento a la izquierda, lo que indica una hiperreactividad. Mientras que en la figura 5-B se encuentra la curva de las SHR₆, que presentó un desplazamiento a la derecha, lo que muestra una hiporreactividad respecto con el comportamiento de las WKY₆.

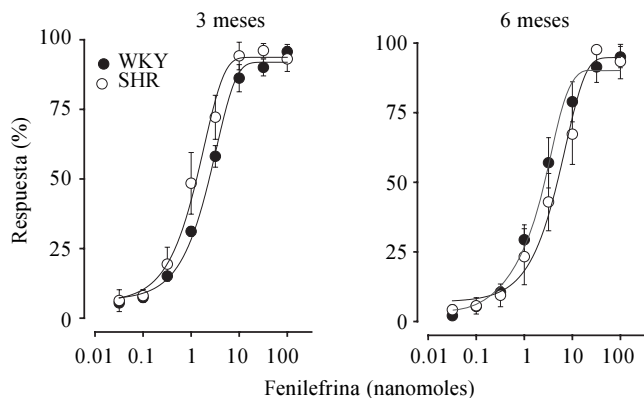


Figura 13. Se presentan tres micrografías de las estructura del mesangio (A), túbulos contorneados distales (B) y túbulos contorneados proximales (C). Todos ellos se muestran sin presencia de proteínas en la luz tubular en los riñones de las WKY₃ H & E aumento 500x y 1000x. En C, además, se puede observar el fenómeno normal de vacuolización, que se encuentra asociado con el transporte normal de las proteínas que llegan a escapar a la barrera glomerular; sin embargo, esta vacuolización sólo se ve en los segmentos superior y lateral derecho (con orientación de un reloj localizadas a las 12 y tres horas).

Resultados

Nuestros resultados (*Cuadro 7*) indican que la participación del óxido nítrico (NO $\cdot$) y las prostaglandinas (PGS) condicionan la reactividad vascular renal de forma diferente en los animales con hipertensión esencial (SHR), probablemente por el efecto del estrés oxidativo durante el desarrollo de la HTAS y por el envejecimiento al comparar las edades de tres meses con las de seis

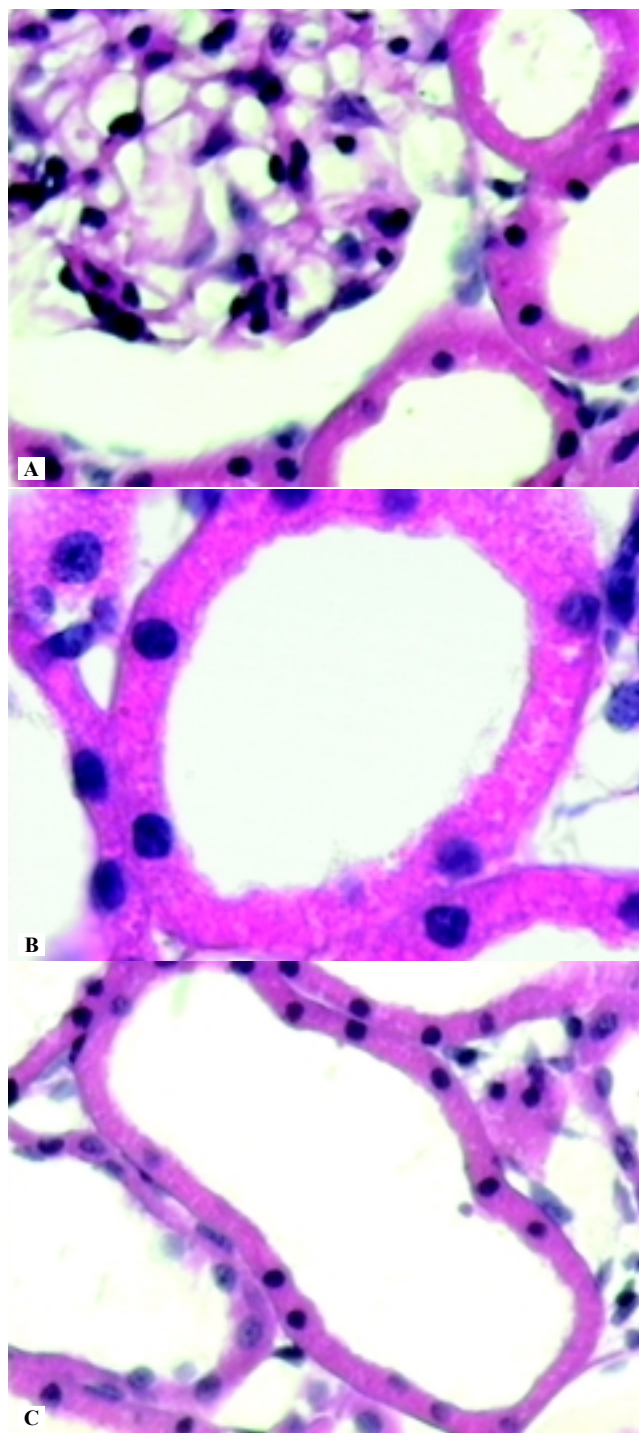


Figura 14 A, B y C. Se muestran tres micrografías de las estructura del mesangio y túbulos contorneados distales y proximales en SHR3 y WKY6 H & E aumento 500x. En A la flechas indican lesión glomerular por pérdida del contorno regular y aumento de los núcleos en la célula mesangial que se refiere a una hipertrofia al comparar con B, donde se aprecian menos núcleos y más espacios vacíos circulares que representan los capilares del glomérulo, las flechas indican la presencia de proteínas en el espacio de Bowman y en la luz de los túbulos contorneados proximales. Sin embargo, en C se observan cambios iniciales por vacuolización anormal que no se observaron en las WKY₃; las flechas indican aumento de proteínas en la luz tubular y aumento de las vacuolas para su transporte de la región apical a la región basal.

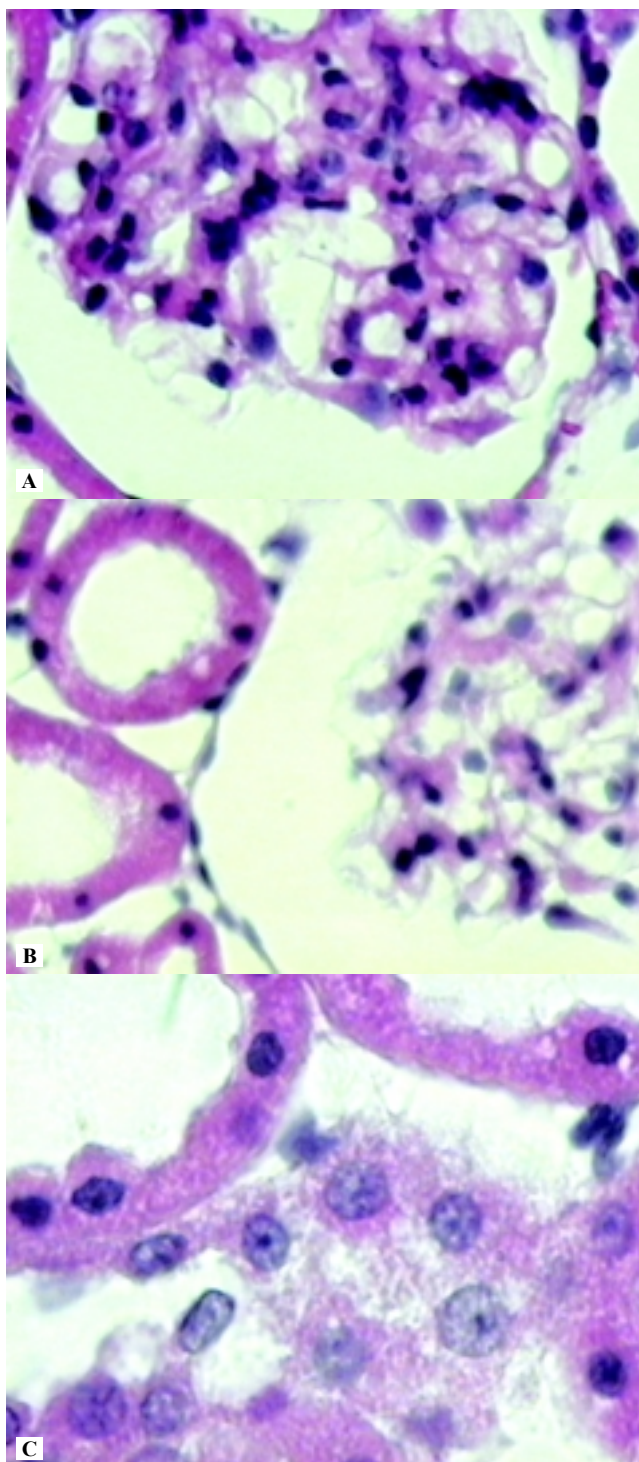


Figura 15 A, B y C. Micrografía 100x que muestra hipertrofia de las células mesangiales, incremento del material intersticial del mesangio en las WKY₆ y disminución de la inmunolocalización de la NOS-2 en túbulos contorneados proximales aumento 100x. El anticuerpo anti-NOS-2 aparece ligeramente dentro de los túbulos contorneados proximales y distales, es evidente un ligero aumento del mesangio.

meses. En la *figura 11* se observan las curvas concentración-respuesta construidas con los promedios expresadas en porcentaje.

Al comparar a los animales hipertensos (SHR) y normotensos (WKY), se observan dos estadios en el desarrollo de la HTAS (*Figura 12-A*) a los tres meses, donde la HTA se encuentra plenamente manifiesta pero de forma inicial, en donde se puede observar una hiperreactividad que probablemente esté condicionada por una disminución en la PGI₂, y un incremento del TXA₂ al comparar las SHR₃ con las WKY₃. Los riñones de las SHR₃ estructuralmente muestran una hipertrofia glomerular y proteínas en los túbulos contorneados proximales en contraste con las WKY₃. Así mismo, se observan diferencias en la inmunolocalización de la NOS-2, de manera que en las WKY₃ se observan en los túbulos contorneados proximales, mientras que en las SHR₃ se observan tanto en los túbulos contorneados proximales como distales (*Figuras 13, 14, 15 y 16*).

En el modelo de HTAS con ratas SHR/WKY durante el desarrollo de la HTA, el NO $\cdot$ y las PGS participan ocasionando diferencias significativas ($p < 0.05$) en la presión de perfusión renal, encontrándose un aumento en la presión de perfusión > 40 mm Hg (*Figura 17*), en las SHR de tres y seis meses al compararlas con las WKY de tres y seis meses; este aumento está condicionado el incremento observado de la presión basal sin estimulación α_1 -adrenérgica de $\Delta 45.62 \pm 10.9$ mm Hg (ANOVA dos vías $p < 0.001$).

Estos resultados confirman que el flujo activa mecanorreceptores en el endotelio de la vasculatura renal, estimulando la generación de NO $\cdot$ y PGI₂ (vasodilatadores). Sin embargo, es posible que la producción basal de TXA₂ en las SHR sea mayor, condicionando que el tono se incline a la vasoconstricción, reflejándose con el aumento de la presión de perfusión basal. Este incremento en la síntesis de TXA₂ se puede explicar por una menor biodisponibilidad de NO $\cdot$,

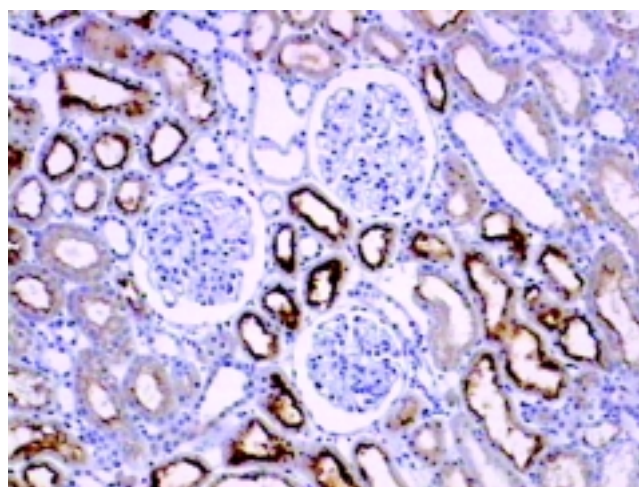


Figura 16. Micrografía 100x que muestra hipertrofia del mesangio en las SHR₃ e inmunolocalización de la NOS-2 en túbulos contorneados proximales aumento 100x. El anticuerpo anti-NOS-2 aparece dentro de los túbulos contorneados proximales y distales, es evidente el aumento del mesangio; sin embargo, el glomérulo no se encuentra destruido como en la *figura 33*.

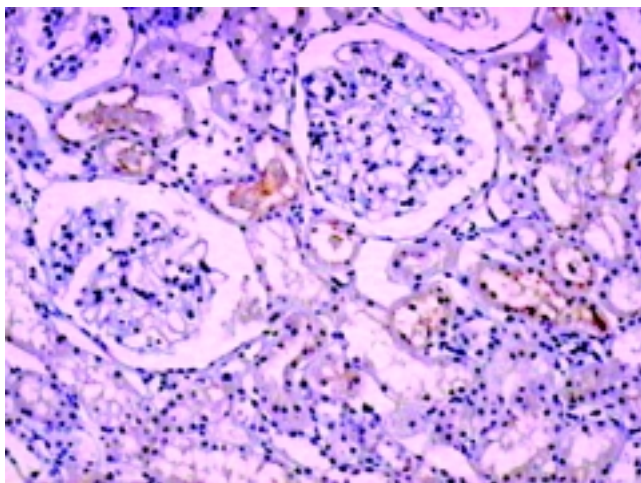


Figura 17. La hipertensión en las SHR depende de las presiones basales (sin estimulación $\alpha 1$ -adrenérgica. La estimulación con fenilefrina presenta curvas dosis dependientes. A los seis meses los animales normotensos (WKY₀) presentan reactividades similares a las observadas en los animales hipertensos de tres meses (SHR₃). Se presentan curvas concentración-respuesta con la presión de perfusión, calculada de la suma del promedio de los incrementos de la respuesta contráctil con FE más la presión basal. Muestran los puntos con diferencias significativas ANOVA método de Student-Newman-Keuls ($p < 0.001$). Existe una $+\Delta$ en las SHR al comparar con las WKY. Las diferencias se pierden a partir de la dosis de (3.2) nanomolas de FE.

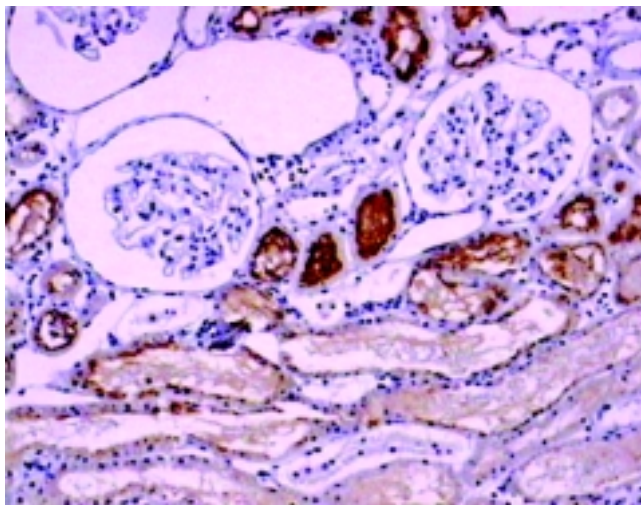


Figura 18. Micrografía 100x que muestra hipertrofia del mesangio y proteínas en túbulos contorneados distales en SHR₆ con inmunolocalización de la NOS-2 (color marrón) en túbulos contorneados proximales. El anticuerpo anti-NOS-2 aparece dentro de los túbulos contorneados proximales y distales, es posible que parte de la NOS-2 se encuentre formando parte de las proteínas filtradas y excretadas a los túbulos.

ocasionada por el estrés oxidativo presente en la HTAS (SHR)^{72,73} el cual condiciona el incremento de ROS que reaccionan con el NO $\cdot$ generado por las NOS, formando los N = O-O $\cdot$ (peroxinitritos), que no tienen efecto vasodilatador y no tienen la capacidad de inhibir la actividad de la tromboxano sintasa.

Es posible que en etapas tempranas del desarrollo de la HTAS (SHR₃) se observa una menor producción basal de PGI₂ en comparación con las WKY₃; en este estadio, la presión de perfusión basal (90.4 ± 9.1 mm Hg) no es suficiente para que la activación de los mecanorreceptores libere prostaciclina de forma suficiente por estrés de cizallamiento, de manera que la actividad biológica de los productos de la tromboxano sintasa superan a la actividad de la prostaciclina sintasa. Sin embargo, en etapas intermedias del desarrollo de la HTAS (seis meses en las SHR), es posible que la desinhibición de la tromboxano sintasa, por la baja disponibilidad de NO $\cdot$, condicione los cambios patológicos, favoreciendo la hipertrofia de la musculatura lisa vascular y del mesangio. Probablemente, la hipertrofia de las células en la vasculatura renal condiciona una mayor producción de NO y PGI₂ en las SHR₆; la actividad biológica de estos autacoides condiciona la disminución en la $i[Ca^{2+}]$, que puede explicar la hiporreactividad observada. Pero también incrementa la presión intraglomerular por una disminución en la resistencia de la arteriola aferente y, por lo tanto, el estrés de cizallamiento en el glomérulo ocasiona disfunción de la barrera glomerular manifestada por proteinuria (Figura 18, 19 y 20), lesionando las membranas lipídicas (Figura 21), lo que facilita una mayor liberación de AA por la PLA₂. Las dos circunstancias favorecen la generación del PGI₂ y la mayor generación de TXA₂. Ya que la PGI₂ se producirá en los vasos de mayor calibre (más musculatura lisa), los vasos de menor calibre, que son los vasos rectos medulares, están más expuestos a la vasoconstricción, condicionando una disminución del flujo

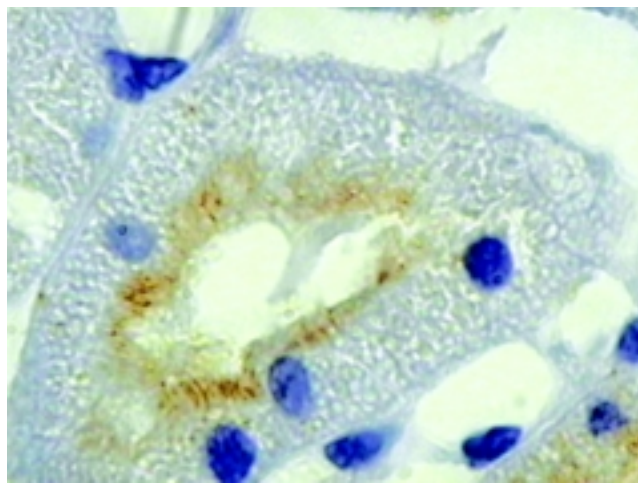


Figura 19. Micrografía 1000x en una SHR₆ en donde se muestra la inmunolocalización de la NOS-2 (marrón) en las células de los túbulos contorneados distales, las flechas indican las proteínas en la luz tubular. El desarrollo de la hipertensión a los seis meses afecta la barrera glomerular incrementando la expresión de la NOS-2 en los túbulos contorneados distales. Así como la proteinuria de la nefropatía hipertensiva. Las células muestran una importante vacuolización, tal vez en un esfuerzo por transportar las proteínas filtradas a la luz tubular en la región apical a la región basal para devolverlas al torrente circulatorio; sin embargo, la capacidad de todo el segmento superior, así como los laterales se encuentran saturados.

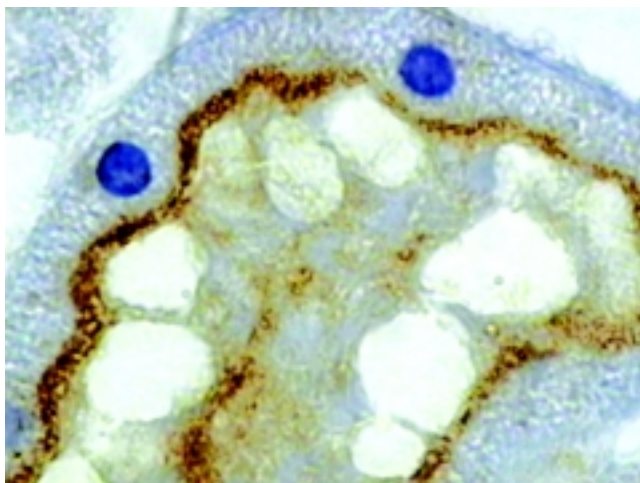


Figura 20. Micrografía 1000x que muestra en la SHR₆ inmunolocalización de la NOS-2 (marrón) en las células de los túbulos contorneados proximales con imágenes de vacuolización en todos los segmentos, por lo tanto hay saturación del mecanismo de transporte normal, por lo que escapan las proteínas a la regiones tubulares del Asa de Henle y túbulos contorneados distales (las flechas indican las proteínas en la luz tubular). La vacuolización de las células de los túbulos contorneados proximales y la expresión de la NOS-2 podría ser un marcador de inflamación de estas células, es muy probable que su función de absorción de las proteínas que se filtran en el glomérulo esté siendo modificada por la expresión de la NOS-2, que se aprecia incrementada en la luz tubular que es el mismo sitio donde se capturan las proteínas.

sanguíneo a nivel medular; produciéndose isquemia y necrosis tubular (aparición de cilindruria).

Estas alteraciones condicionan cambios estructurales que aumentan la presencia de proteínas en los túbulos contorneados proximales y distales, así como la destrucción de los glomérulos con aumento del mesangio y de los contenidos proteicos intersticiales, los cuales, se ha demostrado, modifican la presión del intersticio renal (PHIR), lo que condiciona aumento de las señales que ocasionan la liberación de AGT-II y aldosterona por el aparato yustaglomerular (importantes mecanismos previamente reconocidos como participantes en la fisiopatología de la HTAS). La presencia de la NOS-2* en los túbulos contorneados distales y proximales indica la mayor liberación de NO $\cdot$; sin embargo, esta liberación ocurre en la región cortical (en donde se encuentran los vasos sanguíneos de mayor calibre y los glomérulos), lo que puede antagonizar el efecto vasoconstrictor de la TXA $_2$, pero a nivel de la médula renal (asa de Henle y vasos rectos) no se observa inmunolocalización de las NOS-2.

La reactividad vascular renal a la estimulación α_1 -adrenérgica con fenilefrina en las WKY₃ es modificada significativamente ($p < 0.05$) por la indometacina y en las WKY₆ por el L-NAME e indometacina (*Figura 11*). Estos datos sugieren que las PGS con actividad contráctil (PGG₂ y PGH₂) participan en el mecanismo de contracción por un

* Enzima que se induce generalmente con la señalización de interleucina proinflamatorias; produce 1,000 veces más NO[•] que las NOS-1 y NOS-3.

acoplamiento del receptor α_1 -adrenérgico con proteínas G diferentes a la Gq específica de la PLC, por lo que las WKY (normotensas) tienen la habilidad de activar con fenilefrina a la PLA₂, formando AA que sirve de sustrato para las COX-1 y COX-2, formando durante los primeros 30 segundos PGH₂ que activa receptores que liberan IP₃ y Ca²⁺ del sarcoplasma, éste se metaboliza en PGE₂ y en PGI₂, y contribuye a la relajación. En las WKY, el incremento de

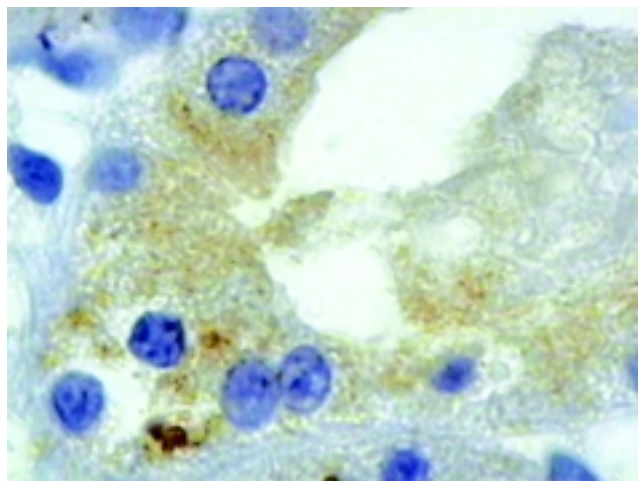


Figura 21. Micrografía 1000x de una SHR₆ se presenta la inmunolocalización de la NOS-2 (marrón) en las células de los túbulos contorneados distales con vacuolización y cambios nucleares prominentes (desprendimiento de células tubulares o cilindruria). Se observa que el desarrollo de la hipertensión a los seis meses afecta incrementando la expresión de la NOS-2 en los túbulos contorneados distales. Así como es evidente la presencia de proteínas en los túbulos contorneados distales. Con deformación de las células de los túbulos contorneados distales con una importante vacuolización. Ya que existe además daño en los glomérulos, la presencia de estas proteínas traduce proteinuria la cual debe obedecer al daño de la barrera glomerular por efecto de la HTA.

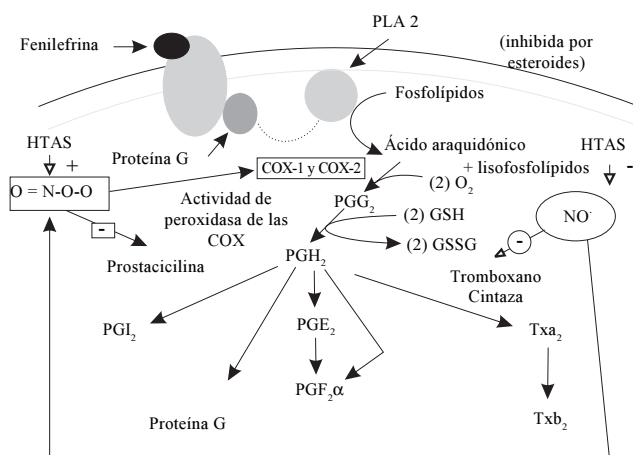


Figura 22. Muestra el mecanismo propuesto que ayuda a explicar nuestros resultados. El peroxinitrito en amarillo tiene la capacidad de inhibir el sitio activo de la prostaciclina sintasa. El óxido nítrico inhibe la expresión de la tromboxano sintasa, por lo que al ser convertido en peroxinitrito pierde su capacidad de inhibir la formación de tromboxano TXA₂, favoreciendo la vasoconstricción y el efecto mitogénico.

la PA estimula la formación del $\text{NO}\cdot$ que favorece la relajación. Sin embargo, tanto en las WKY₆ como en las SHR₃ la participación del $\text{NO}\cdot$ favorece la contracción por acción del estrés oxidativo, formando los peroxinitritos (baja biodisponibilidad de $\text{NO}\cdot$) que dejan de inhibir la tromboxano sintasa, incrementándose la TXA_2 . Sin embargo, en las SHR₃ la inhibición no específica de las NOS (L-NAME) y la inhibición no específica de las COX (indometacina) ocasiona una disminución significativa ($p < 0.05$) en el incremento de la reactividad vascular a la estimulación α_1 -adrenérgica (Cuadro 7).

Estos datos sugieren que en el desarrollo de la HTAS (a los tres meses en la SHR) la respuesta contráctil depende de la generación de $\text{NO}\cdot$ y de la producción de PGS contráctiles (PGH_2 y TXA_2).

Durante el desarrollo de la HTAS, el estrés oxidativo ocasiona que el $\text{NO}\cdot$ reaccione con las ROS y de esta manera se produce el peroxinitrito, que estimula a las COX, de manera tal que se facilita la generación de los PGS contráctiles, que estimulan receptores de tromboxano y de prostaglandina H_2 (que al igual que los receptores α_1 -adrenérgicos) que se encuentran acoplados a proteínas $\text{G}_{q/11}$ y durante su agonismo producen IP_3 liberando el Ca^{2+} intracelular del sarcoplasma, ocasionando la contracción del músculo liso vascular. La *figura 22* muestra el modelo que proponemos como hipótesis para explicar en parte nuestros resultados.

En condiciones de normotensión (WKY₃) el receptor α_1 -adrenérgico tiene la capacidad de acoplarse, además de la proteína $\text{G}_{q/11}$, a otras proteínas G capaces de estimular la PLA_2 , favoreciendo durante la contracción la producción de PGG_2 y PGH_2 , la cual es metabolizada en PGI_2 y de menor forma en TXA_2 por inhibición de la tromboxano sintasa, por acción del $\text{NO}\cdot$, que se libera durante la contracción, y por estimulación del receptor α_{1D} -adrenérgico del endotelio, que activa a la NOS-3.

A diferencia de la hipertensión temprana (SHR₃), el estrés oxidativo produce las ROS⁷³ que forman los peroxinitritos, que por una parte inhiben la prostaciclina sintasa por nitración de su centro activo⁷⁴ y, por otro lado, disminuyen la biodisponibilidad del $\text{NO}\cdot$, y de esta manera liberan la actividad de la tromboxano sintasa, favoreciendo la disminución de la PGI_2 y el incremento de la TXA_2 .

En la *figura 12-B* se muestran los desplazamientos de las curvas hacia la derecha en la SHR₆, al comparar la reactividad a la estimulación α_1 -adrenérgica entre las WKY₆ y las SHR₆, de tal manera que se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) en las respuestas con fenilefrina en las SHR₆. Esta hiporreactividad probablemente se debe a una mayor liberación de PGI_2 que la observada en el estadio inicial de la HTAS (SHR₃). Sin embargo, la hipertensión (presión sistólica mayor) puede explicarse por una mayor producción de TXA_2 y, posiblemente, por otros factores contráctiles liberados por el parénquima renal (AGT-II y endotelina) en compensación con la vasoconstricción ocasionada por el TXA_2 en los vasos rectos de la médula renal (lo que condi-

ciona un proceso similar a la isquemia o hemorragia, que estimulan al aparato yuxtaglomerular de la mácula densa favoreciendo la activación del sistema-renina-angiotensina y mayor generación de aldosterona).

Por otra lado, pareciera que los receptores α_1 -adrenérgicos en las WKY₆ tuvieran una mayor capacidad de producir PGS, las cuales participan durante la contracción formando PGH_2 que participa en la reactividad vascular renal; de esta manera, la WKY₆ posee una mayor capacidad contráctil vascular que la SHR₆ para accionar los mecanismos de autorregulación renal. Por tal motivo, el incremento de catecolaminas que incrementan la presión arterial sistémica en las SHR₆, condiciona menores respuestas contráctiles que las observadas en las WKY₆, lo que condiciona una hiperfiltración, que a lo largo del tiempo condiciona daño en la barrera glomerular e incrementa la salida de proteínas, con lo que se modifica el contenido de espacio intersticial y favorece la retención de Na^+ sistémico, por lo que la HTA se establece y la nefropatía hipertensiva progresa a la insuficiencia renal crónica.

Discusión

Se realizaron laparotomías en el animal anestesiado con pentobarbital (dosis de 40 mg/kg de peso, cuidando todos los aspectos que se solicitan por el Comité de Bioética Animal de la EMGS); mediante el catéter se introdujo Krebs continuamente para evacuar todo el contenido sanguíneo de la vasculatura y los glomérulos. Esto permitió controlar variaciones ocasionadas por sustancias vasoactivas provenientes de los órganos y sistemas del organismo entero, como por ejemplo las glándulas suprarrenales que son retiradas; además de que las conexiones autonómicas nerviosas simpáticas y parasimpáticas son cortadas, otras sustancias con bioactivas provenientes del hígado, pulmón, corazón y cerebro fueron eliminadas por el aislamiento del riñón, en condiciones de flujo, temperatura y concentraciones de electrolitos constantes.

Nuestros resultados apuntan, al igual que otros trabajos,⁵⁷⁻⁶⁷ asumir que el riñón es el órgano crucial en el desarrollo de la HTAS, y aunque los receptores α_1 -adrenérgicos han sido materia de estudio en diversas investigaciones^{69,70} que tratan de determinar los mecanismos involucrados en la patogenia de la HTAS, hasta el presente estudio no se había caracterizado el efecto vasoconstrictor⁶⁸ con la estimulación α_1 -adrenérgica en la reactividad vascular renal, en el modelo animal de hipertensión primaria (SHR/WKY), empleando el sistema de riñón aislado perfundido.^{57,58}

Conclusiones

Con base en nuestros resultados podemos concluir:

1. Se observaron diferencias en la reactividad del músculo liso en los agentes contráctiles α_1 -adrenérgicos, en la vasculatura renal de las ratas espontáneamente hiperten-

- sas al compararlas con las normotensas, y se observaron diferencias en la reactividad del músculo liso, determinadas por la edad durante el desarrollo de la hipertensión, de manera que existen dos estadios: hipertensión temprana, en las SHR₃, en donde se observa hiperreactividad; y en las SHR₆, hipertensión tardía, en donde se observa hiporreactividad a la estimulación α_1 -adrenérgicos con fenilefrina.
- La inhibición del óxido nítrico con L-NAME demostró diferencias entre animales hipertensos y las edades, ya que solamente en los animales normotensos (WKY₃) hubo un efecto presor la inhibición de las NOS. Esto puede ser explicado por la posible existencia de estrés oxidativo acumulativo en los animales hipertensos SHR₃ y SHR₆, así como en los normotensos en proceso de envejecimiento WKY₆. En donde no se observaron cambios con la inhibición de la NOS, posiblemente por existencia de peroxinitritos formados a partir del óxido nítrico y las ROS.
 - La inhibición de las síntesis de PGS con indometacina demostró diferencias entre animales hipertensos y normotensos, así como al compararlos entre sus edades. La reactividad del músculo liso a los agentes contráctiles α_1 -adrenérgicos depende de la producción de PGS contráctiles en las WKY₃, WKY₆ y SHR₃. Mientras que en los animales SHR₆ depende de PGS vasodilatadoras.
 - La hiporreactividad de las SHR₆ a la estimulación α_1 -adrenérgicos con fenilefrina puede estar asociada con los datos morfológicos de mayor daño a la barrera glomerular y con evidencia de proteinuria, ya que esta disminución de reactividad del músculo liso a los agentes contráctiles favorece la hiperfiltración al no poder disminuir el flujo vascular renal en presencia de presión arterial sistémica alta. Además, la inmunolocalización de la NOS-2 en los túbulos contorneados proximales y distales podría ser un marcador de mayor inflamación, por mayor producción de peroxinitritos y otras moléculas bioactivas que favorecen el incremento de la PA a nivel sistémico.⁶⁰

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo económico recibido de: PAPIIT-IN210702-UNAM, del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación EMGS-UDEFA, así como de la Fundación Gonzalo Río Arronte I.A.P.

Referencias

- Osterhues HH, Hombach V, Pfreundschuh & Schölmerich. Fisiopatología y bioquímica. 1a. Ed. Madrid, España: Ediciones Harcourt/Elsevier Science; 2002, p. 170-4.
- Mosterd A, D'Agostino RB, Silbershatz H, Sytowsky PA, Kannel WB, et al. Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989. *N Engl J Med* 1999; 340: 1221-6.
- Rodríguez-Perón JM, Venereo-Gutiérrez JR, Acosta-Cabrera EB, Leyva-Moreno U, R-Mora S. Presente y futuro de los antioxidantes en la hipertensión arterial esencial. *Rev Cub Med Milit* 2002; 31(4).
- Lifton RP. Molecular genetic of human blood pressure variation. *Science* 1996; 272: 676-80.
- Zenteno JC, Kofman-Alfaro S. Aspectos genéticos de la hipertensión arterial. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2003; 66(4): 218-23.
- Suzanne O, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 2003; 139: 761-76.
- Gamba G. La medicina genómica y la fisiopatología de la hipertensión arterial. *Rev Invest Clin* 2002; 54(1): 68-75.
- Zicha J, Kunes J. Ontogenetic aspect of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 1999; 79: 1227-82.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-41.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53: 557-73.
- Palmer RMJ, Ferriga AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
- Falcone JC, Maninger GA. Arteriolar dilation produced by venule endothelium-derived nitric oxide. *Microcirculation* 1997; 4: 303-10.
- Boegehold MA. Shear-dependent release of venular nitric oxide: effect on arteriolar tone in rat atriated muscle. *Am J Physiol* 1996; 271: 387-95.
- Baek SH, Lim JH, Park DW, Kim SY, Lee YH, Kim JR, Kim JH. Group IIA secretory phospholipase A(2) stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF- κ B in macrophages. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2709-17.
- Sánchez-González DJ, Moro MA, Castillo-Henkel C, Herrera-González N, Hernández-Pando R, Larios-Medina FJ, Cobilt R, Blanco JA, Pedraza-Chaverri J, Villanueva C. Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. *Envi Tox Pharm* 2004; 566: 1-7.
- Bullock GR, Taylor SG, Weston AH. Influence of the vascular endothelium on agonist-induced contractions and relaxations in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1986; 89: 819-30.
- Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988; 12: 530-48.
- Criscione L, Muller K, Prescott MF. Endothelial cell loss enhances the pressor response in resistance vessels. *J Hypertension* 1984; 2(Suppl. 3): 441-4.
- Egleme C, Godfraind T, Miller RC. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1984; 81: 16-8.
- Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28: 732-7.
- Bartlett G. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234: 466-8.
- Dohi Y, Thiel MA, Buhler FR, Luscher TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension* 1990; 16: 170-9.
- Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF, Hamilton CA. Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke prone spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol* 1999; 379: 175-82.
- Matsuda K, Sekiguchi F, Yamamoto K, Shimamura K, Sunano S. Unaltered endothelium-dependent modulation of contraction in the pulmonary artery of hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 392: 61-70.
- Rudic RD, Sessa WC. Human genetics'99: the cardiovascular system. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 673-7.
- Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathology* 2000; 190: 244-54.
- Osugi S, Shimamura K, Sunano S. Decreased modulation by endothelium of noradrenaline-induced contractions in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Ach Int Pharmacodyn* 1990; 305: 86-99.

29. Luscher TF, Boulanger CM, Yang Z, Noll G, Dohi Y. Interactions between endothelium-derived relaxing and contracting factors in health and cardiovascular disease. *Circulation* 1993; 87(Suppl. V): V36-44.
30. Luscher TF, Dohi Y, Tschudi M. Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19(Suppl 5): S34-42.
31. Ibarra M, Meneses A, Ransanz V, Castillo C, Hong E. Changes in endothelium-dependent vascular responses associated with spontaneous hypertension and age in rats. *Arch Med Res* 1995; 26(Suppl.): S177-83.
32. Rubanyi GM, Kauser K, Graser T. Effect of cilazapril and indomethacin on endothelial dysfunction in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(Suppl 5): S23-30.
33. Rees D, Ben-Ishay D, Moncada S. Nitric oxide and the regulation of blood pressure in the hypertension-prone and hypertension-resistant Sabra rat. *Hypertension* 1996; 28: 367-71.
34. Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998; 31: 643-8.
35. McIntyre M, Hamilton CA, Rees DD, Reid JL, Dominiczak AF. Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 1997; 30: 1517-24.
36. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35: 1055-61.
37. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 1248-54.
38. Colin DF. Prostaglandin and Leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294: 187.
39. De Witt DL, Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequences. *Proc Natl Sci USA* 1988; 85: 1412-6.
40. Bauersachs J, Popp R, Fleming I, Busse R. Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor: formation and interactions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 57: 439-46.
41. García-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salas M, Rodríguez-Martínez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isofrom. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 75-81.
42. Torres VE, Romero JC, Strong CG, Wilson DM, Walker VR. Renal prostaglandin E during acute renal failure. *Prostaglandins* 1994; 8: 353-60.
43. Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC. Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998; 275: F613-22.
44. Yanagisawa H, Morrissey J, Klahr S. Mechanism of enhanced eicosanoid production by isolated glomeruli from rats with bilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1991; 261: F248-55.
45. Kato T, Iwana Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1990; 15: 475-80.
46. Sánchez PL, Salgado LM, Ferreri NR, Escalante B. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function after renal ablation. *Hypertension* 1999; 34: 848-53.
47. Nakanishi K, Mattson DL, Cowley AW Jr. Role of renal medullary blood flow in the development of L-NAME hypertension rats. *Am J Physiol* 1995; 268: R317-23.
48. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, López-Zetina P, Herrera-Acosta J. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthase gene expression. *Am J Physiol* 1998; 274(Renal Physiol. 43): F791-8.
49. Lu S, Mattson DL, Cowley AW Jr. Renal medullary captopril delivery lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 23: 337-45.
50. Mattson DL, Beleumeur TG. Neural nitric oxide synthase in the renal medulla and blood pressure regulation. *Hypertension* 1996; 28: 297-303.
51. Mattson DL, Lu S, Nakanishi K, Papanek PE, Cowley AW Jr. Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure. *Am J Physiol* 1994; 266: H1918-26.
52. Roman RJ, Kaldunski ML. Renal cortical and papillary blood flow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1988; 11: 657-63.
53. Roman RJ, Zou AP. Influence of the renal medullary circulation on the control of sodium excretion. *Am J Physiol* 1993; 265: R963-73.
54. De Waderner HE. The primary role of the kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension: part I. *Clin Sci* 1990; 79:193-200.
55. Guyton AC. Long-term arterial pressure control: analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 1990; 259: R865-77.
56. Dahl LK, Heine M. Primary role of renal homograft in setting chronic blood pressure levels in rats. *Cir Res* 1975; 36: 692-6.
57. De Waderner HE, Mills IH, Clapham WF, Hayter CJ. Studies on the efferet mechanism of the sodium diuresis which follows the intravenous administration of saline in the dog. *Clin Sci* 1961; 21: 249-58.
58. Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, Giaventi AM, Pagetti D. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47: 435-48.
59. Crowley Jr. AW. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev* 1992; 72: 231-300.
60. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 1983; 309 1009-15.
61. García-Están J, Roman RJ. Role of the interstitial hydrostatic pressure in the pressure diuresis response. *Am J Physiol* 1989; 256: F63-70.
62. Graf C, Maser-Gluth C, Keiser WM, Retting R. Sodium retention and hypertension after kidney transplantation in rats. *Hypertension* 1993; 21: 724-30.
63. Kopf D, Waldherr R, Retting R. Source of the kidney determines blood pressures in young renal transplanted rats. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1993; 265: F104-11.
64. Morgan DA, DiBona GF, Mark AL. Effects of interstitial renal transplantation on NaCl-induced hypertension in Dahl rats. *Hypertension* 1990; 15 436-42.
65. Rettig R, Folberth C, Strauss H, Kopf D, Waldherr R, Unger T. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1990; 258: F606-11.
66. Retting R, Strauss H, Folberth C, Ganten D, Waldherr R, Unger T. Hypertension transmitted by kidney from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1989; 257: F197-203.
67. Strangard S, Hansen U. Hypertension in renal allograft recipients may be conveyed by cadaveric kidneys from donors with subarachnoid haemorrhage. *Br Med J* 1986; 292: 1041-4.
68. Guidi E, Manguetti D, Milani S, Montagnino G, Palazzi P, Bianchi G. Hypertension may be transplanted the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidney coming from donors with or without hypertension in their families. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1131-8.
69. Taddei S, Vanhoutte PM. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 1993; 21: 9-15.
70. Koshimizu T, Yakamuchi J, Hirasawa A, Tanoue A, Tsujimoto G. Recent progress in α -adrenoceptor pharmacology. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(4): 401-8.
71. Asbún BJ, Castillo EF, Escalante BA, Castillo HC. Does segmental difference in α 1-adrenoceptor subtype explain contractile difference in rat abdominal and thoracic aortae? *Vascular Pharmacology* 2002; 38: 169-75.
72. Wayne WD. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a. Ed. México: Edit. Limusa; 1998, p. 245-759.