



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr Leopoldo Ardiles A.
INSTITUTO: Medicina
FACULTAD: Medicina.

“ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE HIPERTENSIÓN SAL SENSIBLE LUEGO DE DAÑO TÚBULO INTERSTICIAL POR L-NAME”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico

IVÁN PATRICIO OLMO MIRANDA

VALDIVIA - CHILE
2006

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	64
ANEXOS.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	75

RESUMEN

El sistema Calicreína Cininas (SCC) renal es un complejo enzimático albergado en el espacio tubulointersticial (TI) renal y cuyos principales componentes son la enzima calicreína y su sustrato cininógeno para producir cininas que poseen actividad vasodilatadora directa, o a través de la liberación de óxido nítrico (NO). El NO es un factor vasodilatador de cardinal importancia y su reducción se asocia al desarrollo de hipertensión y daño renal isquémico-hipertensivo el que puede involucrar estructural y/o funcionalmente al SCC.

Objetivos: Esta investigación pretende analizar la relación entre el daño producido al SCC debido a la inhibición de la síntesis de NO inducida con L-NAME (N^o-nitro-arginina-metil éster) y la posterior aparición de hipertensión sal sensible, al aumentar la ingesta de sal en la dieta.

Materiales y método: Se utilizaron 33 ratas machos de la cepa Sprague Dawley. Se distribuyeron al azar en 4 series: la serie W (control); serie NL (tratada con L-NAME), serie NS (tratada con L-NAME y dieta alta en sal) y serie S (tratada con dieta alta en sal). L-NAME fue administrado a través del agua de bebida en dosis de 116 mg/Kg. La presión arterial sistólica (PAS) fue medida en ratas conscientes con técnica de doppler, y se obtuvieron muestras de orina para la determinación de calicreína urinaria a través de un método amidásico.

Resultados: Los animales tratados con L-NAME manifestaron masiva proteinuria y un aumento de la PAS durante la fase de inducción de daño renal, la que se normalizó al final del periodo de descanso y reapareció sólo cuando los animales fueron expuestos a alimentación alta en sodio. La serie S mostró un aumento moderado de la PAS al ser expuesta a alimentación alta en sodio. La actividad de calicreína al final del experimento se mostró reducida en ambos grupos tratados con L-NAME.

Conclusiones: Estos datos sugieren que la inhibición de la síntesis de NO produce daño al SCC como parte del daño TI y ello puede ser un factor importante en la patogénesis de HTA sal sensible en este modelo.

SUMMARY

The renal Kallikrein Kinin System (KKS) is a multienzymatic located in the renal tubulointerstitial (TI) space, with their principal components the enzyme kallikrein and its substrate kininogen co-located to produce kinins with intense (direct or nitric oxide mediated) vasodilator activity. Nitric oxide (NO) is an important vasodilator and its reduction is associated with the development of hypertension and ischemic-hypertensive renal damage may that involve KKS structures and its activity.

Objectives: This study was designed to evaluate the hypothesis that the damage of the KKS induced by the blockage of the synthesis of NO by L-NAME and the next apparition of salt sensitive hypertension though the salt on diet is increased.

Materials and methods: Thirty three male Sprague Dawley rats were randomly separated in 4 groups: W (controls), NL (L-NAME treated), NS (L-NAME treated and high salt diet) and S (high salt diet). L-NAME was administrated daily in tap water in a dose of 116 mg/Kg. Systolic blood pressure measured and urine collections were obtained for the enzymatic urinary activity of kallikrein determination by the amidasic method.

L-NAME treated rats showed massive proteinuria and increased systolic blood pressure during renal damage induction. High blood pressure decreased after the wash out period and reappeared only in animals exposed to high sodium diet. urinary kallikrein activity was reduced in the L-NAME groups and S group.

Conclusions: This data suggest that the NO synthesis inhibition produces damage at KKS, that is part of TI damage and it could be an important factor in the pathogenesis of salt sensitive hypertension in this model.

INTRODUCCIÓN

Los vasos sanguíneos son un sistema cerrado de conductos que transportan sangre al corazón. La sangre fluye a través de los vasos debido, de modo principal, al movimiento anterógrado impartido por el corazón, aunque en el caso de la circulación sistémica, la retracción diastólica de las paredes de las arterias, la compresión de las venas por los músculos esqueléticos durante el ejercicio y la presión negativa del tórax durante la inspiración, también desplazan la sangre hacia delante. (Ganong)

La resistencia al flujo depende, en grado menor, de la viscosidad de la sangre, pero de manera más importante del diámetro de los vasos, en especial las arteriolas. El flujo sanguíneo a cada tejido es regulado por mecanismos químicos locales, nerviosos y humorales generales, que dilatan o contraen los vasos del tejido. (Ganong)

Los vasos sanguíneos están recubiertos por células endoteliales, las cuales, en conjunto, constituyen un órgano notable que secreta sustancias que afectan el diámetro de los vasos y aseguran su crecimiento y reparación cuando se lesionan, así como la formación de nuevos vasos para llevar sangre a tejidos en crecimiento. (McPhee)

Como es natural, la sangre siempre fluye de áreas de presiones altas hacia áreas de baja presión, excepto en ciertas situaciones en las cuales la inercia sostiene de modo transitorio el flujo. (Ganong)

La presión es distinta en las diferentes partes del sistema circulatorio. Debido a que la acción de bombeo del corazón es de tipo pulsátil, la presión arterial en la aorta sube hasta un valor máximo conocido como presión sistólica durante la eyección cardiaca y disminuye hasta un valor mínimo, al término de ésta, la que se conoce como presión diastólica. (Chatain)

En un adulto normal la presión sistólica es de aproximadamente 120 mm de Hg y la diastólica de 80 mm de Hg. La presión del pulso es la diferencia de las presiones sistólica y diastólica ($120 - 80 = 40$ mm de Hg). (Berne)

La presión arterial puede medirse de modo directo por la inserción de una aguja en una arteria o mediante el método auscultatorio. En este último el manguito inflable familiar, unido a un manómetro, se coloca alrededor del brazo a nivel del corazón y un estetoscopio se coloca sobre la arteria humeral por debajo del manguito; este último se infla hasta por arriba de la presión sistólica que se espera encontrar y después se desinfla poco a poco. A nivel del valor de la presión sistólica se escucha un sonido débil tipo golpe cuando la sangre empieza a pasar más allá del manguito. A medida que la presión sigue bajando, el sonido se hace más fuerte y después sordo y apagado antes de su desaparición final. Estos son los ruidos de Korotkoff producidos por el flujo turbulento en la arteria humeral. (McPhee)

Como la presión arterial es el producto del gasto cardiaco y de la resistencia periférica, se modifica por padecimientos que afecten a cualquiera de estos dos factores, o a ambos. La emoción, por ejemplo, aumenta el gasto cardiaco, y puede ser difícil obtener una presión arterial verdadera en reposo en un individuo excitado o tenso. En general, los aumentos en el gasto cardíaco incrementan la presión sistólica, mientras que los aumentos en la resistencia periférica incrementan la presión diastólica. (Guyton)

Una causa importante de aumento en la presión sistólica es la disminución en la distensibilidad de las arterias; al mismo valor del gasto cardiaco, la presión sistólica es alta en sujetos de edad avanzada que en jóvenes, debido a que hay incremento menor en el volumen del sistema arterial durante la sístole para acomodar la misma cantidad de sangre. (Ganong)

En los seres humanos y en otros mamíferos han evolucionado múltiples mecanismos reguladores cardiovasculares; estos aumentan el riego sanguíneo a los tejidos activos, e incrementan o disminuyen la pérdida de calor del cuerpo por redistribución de sangre. En

presencia de situaciones de peligro, como la hemorragia, mantienen el flujo a los órganos vitales a expensas de la circulación correspondiente al resto del cuerpo. (McPhee)

Los ajustes circulatorios se afectan por alteración del gasto de la bomba (corazón), cambiando el diámetro de los vasos de resistencia (principalmente las arteriolas), o alterando la cantidad de sangre acumulada en los vasos de capacitancia (venas). (McPhee)

El calibre de las arteriolas se ajusta, en parte, por autorregulación, también aumenta en tejidos activos por acción de metabolitos vasodilatadores que se producen de manera local, también lo afectan las sustancias que secreta el endotelio, las sustancias vasoactivas circulantes y por nervios vasomotores. Mecanismos reguladores sistémicos actúan en forma sinérgica con mecanismos locales, y ajustan las respuestas vasculares en todo el cuerpo. (Ganong)

Los términos *vasoconstricción* y *vasodilatación* se usan generalmente para referirse a la constricción y dilatación de los vasos de resistencia. A los cambios en el calibre de los vasos se les llama específicamente *venoconstricción* y *venodilatación*. (Ganong)

Son múltiples los mecanismos fisiológicos conocidos que intervienen en el control de la presión arterial, algunos sistemas son más importantes para la regulación momentánea, o aguda, de la presión sanguínea y reaccionan en segundos o minutos. Otros responden en intervalos de minutos u horas y algunos presentan una regulación a largo plazo de la presión arterial en períodos de días, meses e incluso años. (Ganong)

En condiciones normales existe un equilibrio entre los sistemas que regulan la presión arterial normal y se encuentran tan integrados que si por alguna razón la presión se incrementa, inmediatamente aparece un mecanismo para corregirla. Cuando la presión se mantiene alta es porque existe una disfunción o hay una falla en la interacción de los mecanismos vasculares, cardiogénicos, renales o endocrinos. (Cabrera, 1997)

El sistema de regulación de la presión arterial está integrado por:

1. Los reflejos del sistema nervioso son mecanismos de actuación rápida. Los tres reflejos nerviosos que actúan rápidamente (segundos) son: (Guyton)

- Los mecanismos de retroalimentación de los barorreceptores,
- Los mecanismos isquémicos del Sistema Nervioso Central, y
- Los mecanismos quimiorreceptores.

Tras cualquier caída aguda de la presión, estos mecanismos se combinan para producir:

- Una constricción de las venas y transferir sangre al corazón,
- Un aumento de la frecuencia cardíaca, dándole al corazón una mayor capacidad de bombeo, y
- Una constricción de las arteriolas para disminuir el flujo de sangre fuera de las arterias.

Todos estos efectos se dan casi espontáneamente para elevar la presión arterial al rango de supervivencia. Cuando la presión se incrementa bruscamente en exceso, o cuando se transfunde excesiva sangre, los mismos mecanismos actúan en dirección opuesta, devolviendo la presión al rango normal.

2. Los mecanismos de control a medio plazo actúan después de varios minutos. Tres de los mecanismos más importantes en el control de la presión sanguínea transcurridos algunos minutos desde un cambio brusco de presión son: (Berne, Ganong, Guyton)

- El mecanismo vasoconstrictor Renina-Angiotensina,
- La tensión-relajación del sistema vascular, y

- El desplazamiento de líquido a través de las paredes capilares dentro y fuera de la circulación para reajustar el volumen sanguíneo según las necesidades.

El sistema Renina-Angiotensina es un elemento importante de los mecanismos interrelacionados que regulan la hemodinámica y el equilibrio de agua y electrolitos. Los factores que activan el sistema son la disminución del volumen sanguíneo, la presión de perfusión renal o la concentración de sodio en el plasma.

Dentro de las funciones del sistema Renina-Angiotensina tenemos un efecto sobre el Sistema Nervioso Central con un aumento del consumo de agua y mayor secreción de vasopresina, la contracción de las arteriolas y capilares (aumento de la resistencia periférica total) y aumento de la presión arterial, ligera vasoconstricción (aumento del gasto cardíaco), aumento de la retención de agua y electrolitos, estimulación de la síntesis y secreción de aldosterona, la que por su parte media cambios en los canales de sodio en el epitelio tubular distal lo que aumenta la excreción de potasio y aumenta la reabsorción de sodio y agua en los túbulos renales a la vez que disminuye la producción de orina y aumenta el líquido extracelular.

El mecanismo de tensión-relajación actúa cuando la presión en los vasos sanguíneos es muy elevada, los vasos empiezan a distenderse y lo siguen haciendo con mayor intensidad según los minutos o las horas. Como consecuencia, la presión en estos vasos tiende a bajar hasta valores normales.

El mecanismo de desplazamiento de líquidos a través de los capilares, consiste en que cada vez que la presión baja demasiado, se absorbe líquido desde los tejidos hacia la circulación, de esta manera aumenta el volumen sanguíneo, lo que a su vez ayuda a que la presión sanguínea vuelva a un valor normal. A la inversa, cuando la presión en los capilares

se eleva demasiado, se pierde líquido desde la circulación a los tejidos con lo que se reduce el volumen sanguíneo y la presión arterial.

Este mecanismo necesita de varias horas para mostrar una respuesta significativa, pero actúa de manera muy potente para controlar la presión arterial a lo largo de los días, semanas y meses. Mientras la función renal sea normal, las alteraciones que tienden a modificar la presión arterial, como el aumento de la resistencia periférica total, tienen unos efectos mínimos sobre la presión sanguínea en períodos de tiempo prolongados. Los factores que modifican la capacidad de los riñones para excretar sal y agua pueden provocar importantes cambios a largo plazo en la presión arterial. Este mecanismo, si tiene el tiempo suficiente, llega a controlar la presión arterial hasta llevarla a un nivel en que la eliminación de sal y agua por parte de los riñones es normal.

Muchos factores diferentes pueden afectar a este mecanismo renal y la regulación de los líquidos corporales y, por tanto, al control a largo plazo de la presión sanguínea. Uno de los más importantes es el sistema Renina-Angiotensina, que hace posible que una persona ingiera cantidades muy pequeñas o grandes de sal con cambios mínimos de la presión arterial. Por tanto, el control de la presión arterial se inicia con las medidas de los reflejos nerviosos, continúa con las características mantenidas de los controles intermedios de la presión y finalmente se estabiliza a nivel de la presión a largo plazo mediante el mecanismo de retroalimentación renal y de los líquidos corporales.

El sistema cardiovascular posee gran importancia en el control de la presión arterial y los factores que afectan el calibre de las arteriolas del cuerpo y, por tanto, la resistencia periférica y el flujo sanguíneo tisular se califican en: (McPhee)

Factores vasoconstrictores

Factores locales

- Disminución local de la temperatura.
- Autorregulación.
- Serotonina liberada localmente por las plaquetas

Factores producidos por las células endoteliales

- Endotelina – 1

Hormonas

- Noradrenalina.
- Adrenalina (a excepción del músculo esquelético e hígado).
- Arginina vasopresina
- Angiotensina II
- Inhibidor circulante de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa.
- Neuropeptido Y

Control neural

- Aumento de la carga de los nervios vasomotores noradrenérgicos.

Factores vasodilatadores

Factores locales

- Aumento de CO_2 , K^+ , adenosina, lactato.
- Disminución del O_2 .
- Aumento de la temperatura local.
- Productos de células endoteliales.
- Óxido nítrico (ON).

Hormonas

- Péptido intestinal vasoactivo.
- CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina en su variante α).
- Sustancia P.
- Histamina.
- *Cininas*.
- Péptido natriurético auricular (ANP).
- Adrenalina en el músculo esquelético e hígado.

Control nervioso

- Activación de fibras colinérgicas dilatadoras hacia el músculo esquelético.
- Disminución de la descarga de los nervios vasomotores noradrenérgicos.

Cabe destacar entre estos mecanismos de regulación de la presión arterial a las cininas que integran un sistema denominado Calicreína–Cininas (SCC). Se conocen dos sistemas Calicreína-Cininas, uno plasmático y otro glandular, ambos presentan diferencias tanto en propiedades fisicoquímicas como también en el tipo de cininas que liberan. Las calicreínas glandulares (producidas en órganos como páncreas, riñón y glándulas salivales) presentan una semejanza química e inmunológica, diferenciándose de la calicreína plasmática porque ésta última ofrece una estructura muy diversa y un tamaño molecular muy superior. Además está involucrada en el proceso de coagulación sanguínea, inflamación, conversión de plasminógeno en plasmina, etc. El tipo de cininas que libera la calicreína plasmática es la bradicinina y la glandular libera calidina. (Bhoola y col., 1992)

La síntesis ocurre a partir de la pre-calicreína, la que posteriormente se activa y forma la calicreína, que actuando sobre el cininógeno de bajo peso molecular (CBPM) lo convierte en calidina y sobre el de alto peso molecular (CAPM) en bradicinina. Además la acción de

aminopeptidasas sobre la calidina la convierte también en bradicinina y ambos, la calidina y la bradicinina son inactivadas por la cininasas I y II (esta última es la enzima convertidora de la angiotensina) en péptidos inactivos. Este sistema actúa como un complejo sistema paracrino regulando la excreción de agua y electrolitos (sodio y potasio), es por esto que un incremento o disminución de la presión arterial desencadenarían la activación o inhibición de este sistema. (Florez, Katzung)

Se conoce al SCC como un complejo enzimático albergado en el espacio tubulointersticial, cuyos principales componentes son la calicreína, el sustrato cininógeno, sustancias efectoras o cininas (lisil bradicinina y bradicinina), enzimas metabolizadoras (varias cininasas, entre ellas la Cininasa II o enzima convertidora de angiotensina) y un sinnúmero aún no determinado de activadores e inhibidores de calicreína (Bhoola y col., 1992; Vio y col., 1992).

La producción de calicreína renal se localiza en el túbulo de conexión, ubicable en la corteza renal, y el cininógeno es producido en células de los túbulos colectores renales, distalmente en la nefrona (Croxatto, H., 1981; Figueroa y col., 1988)

Las cininas inducen (Croxatto, 1981):

- Un intenso efecto vasodilatador que aumenta en forma apreciable el flujo sanguíneo renal;
- Un incremento en la excreción de sodio (natriuresis), y,
- Un fuerte estímulo de la síntesis local de prostaglandinas.

Se han identificado tres cininas en los mamíferos: bradicinina, lisilbradicinina (también conocida como calidina) y metionilisilbradicinina. Las tres cininas se han encontrado en el plasma, pero la bradicinina es el tipo dominante; todas estas cininas también se encuentran en la orina. La lisilbradicinina es la cinina urinaria principal y es probable que se forma por la

acción de la calicreína renal. La bradicinina es generada a partir de la lisilbradicinina por una aminopeptidasa renal. (Katzung)

Las cininas producen una vasodilatación notable en diversos lechos vasculares, incluyendo corazón, riñones, intestinos, músculo esquelético e hígado. En el plasma son potentes vasodilatadoras, aumentan la permeabilidad capilar, aumentan la liberación de histamina por los mastocitos, disminuyen la resistencia periférica total y la presión arterial por la dilatación de las arteriolas sistémicas (Elghozi, 1988 ; Katzung).

La bradicinina causa relajación del endotelio de los vasos sanguíneos, actúa activando la síntesis de prostaciclina (PGI) y estimulando la liberación de óxido nítrico (NO), con esto último se reduce la respuesta vasoconstrictora a noradrenalina y angiotensina II, la utilización de inhibidores de la síntesis de NO han demostrado una reducción en el efecto de relajación producido por la bradicinina. Por esto se ha propuesto que las cininas causan la vasodilatación principalmente a través de la liberación de NO de células endoteliales (Katzung; Zhang y col., 1997).

Uno de los primeros estudios acerca de la función del NO fueron realizadas en neutrófilos y macrófagos de roedores, también en preparaciones aisladas de músculo liso vascular, en donde luego de provocar un estímulo con acetilcolina o carbacol, el endotelio liberaba un vasodilatador de vida breve conocido luego como “factor relajante derivado del endotelio” (EDRF), ya que esta sustancia estimuló la relajación del músculo liso precontraído. (Katzung)

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular, da origen a una directa vasodilatación. Este factor es producido por la célula endotelial como consecuencia de estímulos fisiológicos, del estrés o de los estímulos químicos que in vivo puedan ejercer la acetilcolina y/o la bradicinina sobre sus respectivos receptores en la pared endotelial. (Rodrigo y col., 2001)

Tras comprobarse que el EDRF influía sobre el tono vascular general y en particular en el flujo sanguíneo cerebral, se demostró que este factor tenía las mismas características funcionales que el NO o las de un compuesto estrechamente relacionado con él, demostrándose también que el NO era producido por una familia de enzimas que se llamarían óxido nítrico sintetasas (NOS). (Rodrigo y col., 2001)

Debido a las características del NO, esta molécula no puede ser almacenada; debido a esto, la regulación de la enzima que cataliza su síntesis es muy importante. Hasta el momento, han sido identificadas tres isozimas de la NOS, constituidas por unidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 kDa. Las tres isoformas están codificadas en tres genes localizados en tres cromosomas diferentes. La nomenclatura de la NOS se ha prestado ha confusión; actualmente se utiliza la aceptada por la Unión Internacional de Farmacólogos (IUPHAR). (Alfieri y col., 2001 Kone y col., 1997)

Una de las isoformas es constitutiva (cNOS) y la otra inducible (iNOS). Con la denominación cNOS identificamos a la vez a dos isoformas; una denominada endotelial (eNOS), por estar presente mayoritariamente en las células endoteliales de la pared de los vasos y con un tamaño de 135 kDa. La otra NOS constitutiva ha sido denominada neuronal (nNOS) por encontrarse preferentemente en el cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico. Finalmente la isoforma de la NOS inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios se la conoce como iNOS. (Rodrigo y col., 2001)

Las isoformas cNOS son dependientes de calcio y calmodulina, actuando sobre la L-arginina, el dinucleótido de nicotiamida–adenín–fosfato reducido (NADPH) y el oxígeno molecular como sustratos y utilizando como cofactores flavín–adenín–dinucleótido (FAD) y flavín–adenín–mononucleótido (FMN). (Dominiczak y col., 1995; Rodrigo y col., 2001)

En la síntesis de NO por la acción de la NOS en células de mamíferos intervienen 5 electrones del nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1.5 moles de NADPH y 2 de dioxígeno

por cada mol de NO formado. La reacción consiste en dos actos separados de monooxigenación, consistiendo el primer acto en la incorporación de un átomo de O₂ al sustrato, a la vez que otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose la N-hidroxi-L-arginina (NOH-L-Arg) como producto intermedio. El segundo acto cuenta con que un electrón de la NADPH, otro de la NOH-L-Arg y el O₂ en forma de dioxígeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, facilitando la incorporación de O₂ y la excisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y dando lugar a L-citrulina. Además en esta segunda reacción un átomo de O₂ se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el NO (Mondaca y col., 1991; Rodrigo y col., 2001)

El NO es un gas con propiedades de los radicales libres, que actúa como una molécula mensajera de gran inestabilidad y vida corta, difundiendo por cualquier punto de la membrana. En el caso de que la diana sea la célula muscular lisa que forma la pared vascular, estimula en ella, una vez difundida a través de las membranas celulares, la guanilato ciclasa soluble para catalizar la síntesis del guanosina monofosfato cíclico (cGMP) y con ello inducir definitivamente la relajación muscular y por ende, la vasodilatación, regulando el flujo y la presión sanguínea. (Rodrigo y col., 2001)

En un principio, el óxido nítrico era considerado un contaminante más del smog. Sin embargo, nuevos descubrimientos han mostrado que muchas células sintetizan NO y que esta molécula simple tiene funciones importantes en la regulación de los sistemas nervioso, cardiovascular e inmunológico. (Katzung)

El NO tiene un efecto importante sobre el tono del músculo liso vascular y sobre la presión arterial. Esta sustancia se libera por acción de la acetilcolina y por la de otros vasodilatadores dependientes del endotelio. (Dominiczak y col, 1995)

El NO desempeña un papel muy importante en la regulación de la función renal. Su importancia en la hemodinámica renal ha sido demostrada en situación basal, en respuesta a

vasodilatadores endotelio-dependientes (bradicinina y acetilcolina), la disminución de NO provoca una vasoconstricción de las arteriolas aferente y eferente. El NO tiene importancia en la regulación de la reabsorción tubular de sodio y agua, disminuyendo la reabsorción de sodio en varios segmentos tubulares, sin embargo, un efecto directo sólo parece tener lugar en los túbulos colectores medulares, donde se encuentra la mayor actividad de la enzima NOS. El NO está implicado en la regulación de la eliminación de sodio durante las elevaciones de la presión arterial y del volumen extracelular. El descenso del NO aumentaría la secreción de renina y angiotensina II intrarrenal (Tresguerres y col., 1999).

Cuando hay una disfunción en el endotelio, lo primero que sucede es una pérdida de la capacidad de producción de NO y obviamente que la consecuencia será el predominio de sustancias vasoconstrictoras. (Cárcamo, 2000)

Pruebas adicionales sobre la acción fisiológica que desempeña el NO, es la observación de que cuando se administran varios derivados de la arginina (L-NAME) que inhiben la NOS a animales experimentales, hay una elevación pronta de la presión arterial. Esto sugiere que es necesaria la liberación tónica de NO para mantener la presión arterial normal. La inhibición crónica de la NOS produce un bloqueo de NO, además reduce la tasa de filtración glomerular, disminuye la excreción de sodio urinario y produce un incremento de la actividad de renina plasmática lo que produce una hipertensión arterial progresiva asociada a proteinuria y a un severo daño vascular, intersticial y glomerular en riñón. (Quiroz y col, 2001; Zatz y Baylis, 1998)

Un punto clave para el descubrimiento de las funciones fisiológicas del NO fue el hallazgo de que análogos de L-arginina actúan como inhibidores específicos y competitivos de la NOS. El primer compuesto con estas características a ser identificado fue un derivado metilado simple de dicho aminoácido, la N^o-monometil-L-arginina (L-NMMA), el cual fue inicialmente utilizado en estudios de acciones citotóxicas de macrófagos activados, mucho

antes de que se descubriera que el NO participa en dicho proceso. Han sido descubiertos un gran número de análogos de la L-arginina que inhiben la actividad de la NOS, algunos con actividad irreversible o con capacidad de inhibir tanto a la isoforma inducible como a la constitutiva. (Alfieri y col., 2001; Campbell, 2006; Rees y col., 1990)

Como inhibidores de la actividad de la NOS se señalan dos compuestos, la N^o-monometil-L-arginina (L-NMMA) y la N^o-N^o-dimetil-L-arginina asimétrica (L-ADMA), que pueden producirse a partir de residuos de arginina tras metilación durante la renovación proteica. Estos compuestos en condiciones fisiológicas se encuentran en concentraciones bajas, pero en situaciones patológicas, como es el caso de las afecciones renales, pueden llegar a tener concentraciones bastantes elevadas que pueden disminuir la síntesis de NO. Otros inhibidores como la N^o-nitro-L-arginina (L-NNA), su éster la N^o-nitro-arginina-metil éster (L-NAME) y la N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) pueden inhibir de manera preferente a las isoformas constitutivas de la NOS mientras que la N^o-amino-L-arginina y la aminoguanidina inhiben la iNOS de los macrófagos de una manera selectiva. (Rodrigo y col., 2001; Campbell, 2006; Rees y col., 1990)

Estudios han demostrado que ratas tratadas con inhibidores del NO presentan un marcado incremento en el número de anormalidades renales, observándose infiltración macrofágica que ha sido asociado con progresión de injuria glomerular y tubulointersticial.(Quiroz y col., 2001) Algunos autores, utilizando un modelo de inhibición de la síntesis del NO en ratas preñadas, observaron elevada presión arterial, reducción de la actividad plasmática de renina y reducción significativa de la actividad de calicreína urinaria y calicreína tisular asociada con anormalidades morfológicas renales. (Salas y col., 1999)

La inhibición del NO intensifica la adhesión y migración leucocitaria, la expresión de moléculas de adhesión y colágeno tipo I, en consecuencia estimula la proliferación celular e infiltración macrofágica, por lo tanto, la inhibición crónica del NO puede favorecer al

desarrollo de la inflamación renal. El bloqueo del NO está entonces asociado con el desarrollo de injuria renal focal, caracterizada por glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial, lesión arterial y arteriolar e infiltración celular en áreas tubulointersticiales del riñón. (Fuhijara y col., 2001; Quiroz y col., 2001).

El modelo de inhibición crónica de la síntesis de NO induce vasoconstricción renal y con esto injuria renal microvascular y tubulointersticial lo que lleva a la inflamación renal, efecto esperado por la conocida función del NO como agente endógeno anti-inflamatorio por inhibir la proliferación celular, adhesión de leucocitos, expresión de adhesión de moléculas y adhesión plaquetaria. La inflamación se considera como un elemento inseparable de daño, jugando un rol central en la patogénesis de nefropatías de origen no inmune (Fuhijara y col., 2001). De modo que no sólo se produce elevación de la presión arterial sino que también un daño vascular y parenquimal del riñón. Por lo tanto, a través de la administración de L-NAME se genera daño en el tejido tubulointersticial del riñón y con esto daño al Sistema Calicreína-Cininas. (Ardiles y col., 2003)

Existen revisiones sobre el rol que tiene la ingesta de sal en enfermedades del riñón, particularmente en lo referente a la hemodinámica renal, a la excreción renal de proteínas, cambios morfológicos renales y progresión de la falla renal crónica. Estudios experimentales han demostrado un efecto directo del alto consumo de sal sobre el riñón, independiente de su capacidad de aumentar la presión arterial, induciendo la hipertrofia y fibrosis. (Ojeda, 2003)

Desde hace medio siglo se conoce la relación directa entre el consumo de sal, el incremento de la presión arterial y el riesgo de enfermedad cardiovascular. Diferentes estudios epidemiológicos han comparado los niveles de presión arterial sistólica en poblaciones con ingestas bajas y altas de sal. Los resultados han demostrado que existe una mayor incidencia de hipertensión arterial, así como de morbilidad y mortalidad cardiovascular, en poblaciones que consumen alta cantidad de sal. (Alfieri y col., 2001, Weinberger 1996)

Cerca de un 50 % de los pacientes con hipertensión arterial y de un 30 % de los sujetos normotensos, parecen ser sensibles a los cambios en la ingesta de sal (o “sal sensibles”). Esta sensibilidad se manifiesta como aumentos de su presión arterial media de al menos 10 mm Hg. Durante una dieta de sal de 200 mEq/d (alta sal) en comparación con su presión arterial media durante una dieta de sólo 10–20 mEq/d de sal (baja sal). Por otra parte, se considera que un sujeto es “sal resistente” cuando su presión arterial media experimenta cambios menores de 3 mm Hg al ser sometido a una dieta alta en sal, como la antes descrita. Es un hecho que, en comparación con los sujetos hipertensos sal resistentes, los individuos hipertensos sal sensibles tienen mayores incrementos de presión arterial con la edad, tienen una mayor incidencia de hipertrofia ventricular izquierda y de microalbuminuria, así como mayores niveles de marcadores de lesión endotelial y de eventos cardiovasculares fatales y no fatales. (Alfieri y col., 2001, Weinberger 1996)

A pesar del interés en el área y de su importancia clínica, aún no se conocen con certeza los factores determinantes de la sensibilidad a la sal en humanos y las implicaciones del NO en la aparición de la misma. Han sido publicados estudios realizados en animales de experimentación, en los cuales se había demostrado que el NO juega un papel importante en el control de la excreción de sodio y en la hemodinámica renal. (McPhee) Para este estudio se utiliza la inhibición de NO con L-NAME como agente de daño TI no inmune y no el efecto de este NO inhibido como objeto de estudio. Mediante la cría endogámica selectiva, Dahl fue capaz de desarrollar dos cepas de ratas: una sensible a la sal que mostraba un incremento en la presión arterial cuando se alimentaba con una dieta abundante en sal; y ratas resistentes a la sal que no respondían de esta manera. Los mecanismos genéticos responsables de estas diferencias entre las cepas aún se investigan. Pudiera existir una división similar de los humanos en sensibles a la sal y resistentes a la misma, aunque obviamente las líneas de división entre los grupos son menos notables. En los caucásicos con hipertensión esencial y

función renal normal el porcentaje es de aproximadamente 55. Por razones desconocidas, un porcentaje más grande de hipertensos de raza negra es sensible a la sal. Estas cifras tienen significados obvios en términos de recomendaciones acerca de la ingestión de sal en la hipertensión. (McPhee)

La participación del SCC en el control de la excreción de sodio y agua a nivel renal y en la regulación de la presión arterial, ha sido propuesta por algunos autores. Este sistema se gatilla y comienza a inducir natriuresis y diuresis cuando se produce una acumulación de sodio producto de un exceso en la ingesta o de la liberación de aldosterona, actuando como una válvula de seguridad ante la acumulación de sodio. Las cininas, al actuar como vasodilatadores y favorecer la excreción de sodio pueden proteger de la sensibilidad a la sal. Existen evidencias de la participación del SCC en la patogénesis de la hipertensión arterial esencial en humanos, caracterizándose por presentar bajos niveles de renina, normales de aldosterona y una reducción en la excreción de calicreína urinaria. La eliminación de calicreína está reducida tanto en hipertensión primaria como secundaria. (Katori y col., 2003; Madeddu y col. a, 1996; Madeddu y col. b, 1997)

Cabe señalar que en muchos modelos experimentales de hipertensión, como es el caso del modelo de hipertensión renovascular Goldblatt, se ha demostrado la reducción de calicreína tisular en orina. En ratas Dahl sal sensibles se muestran bajos niveles de calicreína en orina comparado con ratas sal resistentes, esto se complementa con las observaciones que en hipertensos sal sensibles existe una menor excreción de calicreína urinaria que en aquellos resistentes a la sal. Es por esto que las mediciones de calicreína urinaria son de gran utilidad en el estudio del daño renal y de la aparición de sal sensibilidad en hipertensos. (Antri, 2004)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Chile la hipertensión arterial es una enfermedad que presenta una alta prevalencia. Uno de los factores importantes relacionados con el desarrollo de esta patología es la sensibilidad a la sal, esto se puede definir como un aumento de la presión arterial cuando ocurre un cambio en la dieta debido a un aumento en el consumo de ésta. Este efecto puede darse tanto en aquellos individuos que presentan una hipertensión esencial como en aquellos que presentan un daño renal parenquimatoso.

Los estudios de los mecanismos vasoconstrictores y de retención de sodio son muy amplios en el caso de la hipertensión sal-sensible, no así en el caso de la acción antagónica de aquellos mecanismos vasodilatadores y natriuréticos que cumple el sistema Calicreína-Cininas renal.

Varias investigaciones han demostrado que el daño tubulointersticial no inmune se desarrolla tempranamente lo que hace favorable la aparición de sal-sensibilidad. Existen además muchas evidencias de la importancia de que un daño en este compartimento favorece la progresión de gran parte de las enfermedades renales, independiente de su origen primario.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y sabiendo que conocemos bastante respecto de la asociación entre el daño tubulointersticial, la activación del sistema Renina-Angiotensina, sal-sensibilidad y aumento de la presión arterial resulta de gran interés el poder conocer la función de este sistema contraregulador (sistema Calicreína-Cininas), su relación con el daño tubulointersticial y los efectos que pueden existir en la aparición de la sal-dependencia y alteración de la regulación tensiorenal.

Este trabajo incluye un modelo animal de daño tubulointersticial no inmune por la inhibición del óxido nítrico en el que una vez eliminada la noxa inicial, hay presentación de hipertensión sal-sensible relacionada con el daño tubulointersticial persistente.

Tomando en cuenta la localización de los componentes del sistema Calicreína-Cinina, resulta razonable plantearse que en relación con el daño tubulointersticial, de cualquier índole, pueda verse afectado este sistema y con esto haber una alteración de la función reguladora de la presión arterial, dejando de esta forma sin contrapeso la acción de los sistemas vasoconstrictores como los sal-retenedores activados.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El daño intersticial no inmune por la administración de L-NAME establece las condiciones para la aparición de hipertensión arterial sal dependiente. Una alteración del sistema Calicreína-Cinina, como parte del daño TI inducido, puede jugar un rol importante en la patogénesis de esta sal sensibilidad.

OBJETIVO GENERAL

- 1) Estudiar la participación del Sistema Calicreína-Cinina renal en la patogénesis de la hipertensión sal-dependiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Demostrar la aparición de hipertensión sal-dependiente como resultado del daño tubulointersticial no inmune inducido a través de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico.
- 2) Estudiar la relación entre daño tubulointersticial, actividad del Sistema Calicreína-Cininas renal y la aparición de hipertensión arterial sal-dependiente en este modelo de sal sensibilidad inducida por daño tubulointersticial.
- 3) Evaluar la relación entre magnitud del daño tubulointersticial, actividad urinaria de calicreína y los niveles de presión arterial.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material

Material biológico:

Se utilizaron como animales de experimentación ratas, machos de la cepa Sprague Dawley, con un peso inicial de 300 gramos (12 semanas) aproximadamente y sin proteinuria basal, procedentes del bioterio del Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Los animales fueron mantenidos en una sala con temperatura constante de 22 °C y con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad.

Material farmacológico:

- N-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME).
- Éter (Merck ®).
- Agua de la llave.
- Solución salina isotónica NaCl 0.9 %.

Material para medir presión arterial:

- Equipo ultrasonido Doppler (Ultrasonic Doppler Detector Model 811-B).
- Esfigmomanómetro y manguito inflable.
- Gel para ultrasonido.
- Cubículo de inmovilización.
- Fuentes de calor.

Materiales para recolección de orina:

- Cajas metabólicas.
- Embudos.
- Frascos recolectores.de propileno de 50 mL.
- Papel filtro.
- Probetas graduadas.
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL.

Materiales para determinación de Creatinina urinaria y sérica:

- Kit comercial Wiener® para determinación cuantitativa de creatinina en suero y orina.
- Espectrofotómetro Shimadzu ®

Materiales para la determinación de Proteinuria:

- Tiras reactivas Combina 3 Test ®.

Materiales para determinación de Caliceína urinaria:

- Buffer Tris-HCl pH 8.2.
- Sustrato sintético DL-Val-Leu-Arg-p-nitroanilide (V2628 SIGMA Aldrich)
- Inhibidor enzimático SBTI-EDTA (inhibidor Tripsínico de Soya 1.5 mg/mL y EDTA 1.9 mg/mL.
- Ácido acético 50% v/v.
- Espectrofotómetro Shimadzu ®.

Otros materiales

- Sal de mesa.
- Balanza Söehnle
- Matraces de 100, 250 y 1000 mL.
- Espátula metálica.
- Vidrio reloj.
- Jeringas.
- Tubos Eppendorf.

2. Método

Condiciones experimentales:

El experimento consta de un total de 8 semanas, las tres primeras fueron de inducción de daño (según serie experimental) luego se continuó con un periodo de descanso (wash out) y por último las cuatro últimas semanas fueron de sobrecarga de sal en la dieta según serie.

Series experimentales:

Se constituyeron 4 series experimentales, con individuos asignados al azar, de las cuales la serie 1 estuvo constituida por 8 individuos y las series 2, 3 y 4 por 10 individuos cada una, todas las series recibieron agua de la llave.

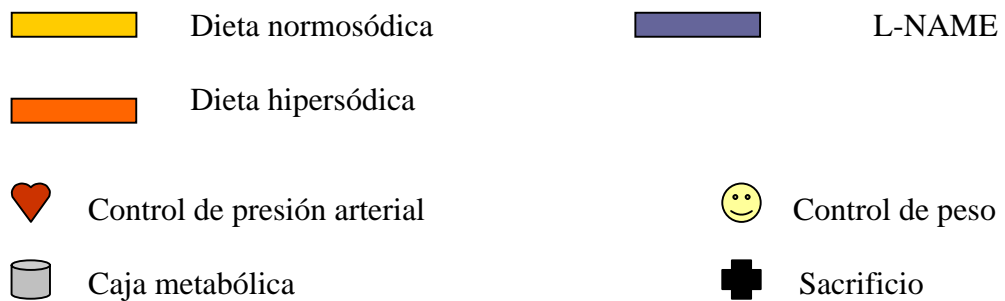
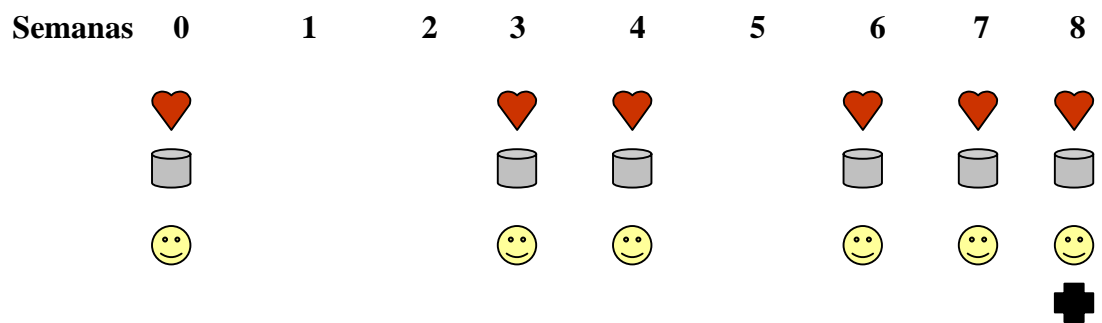
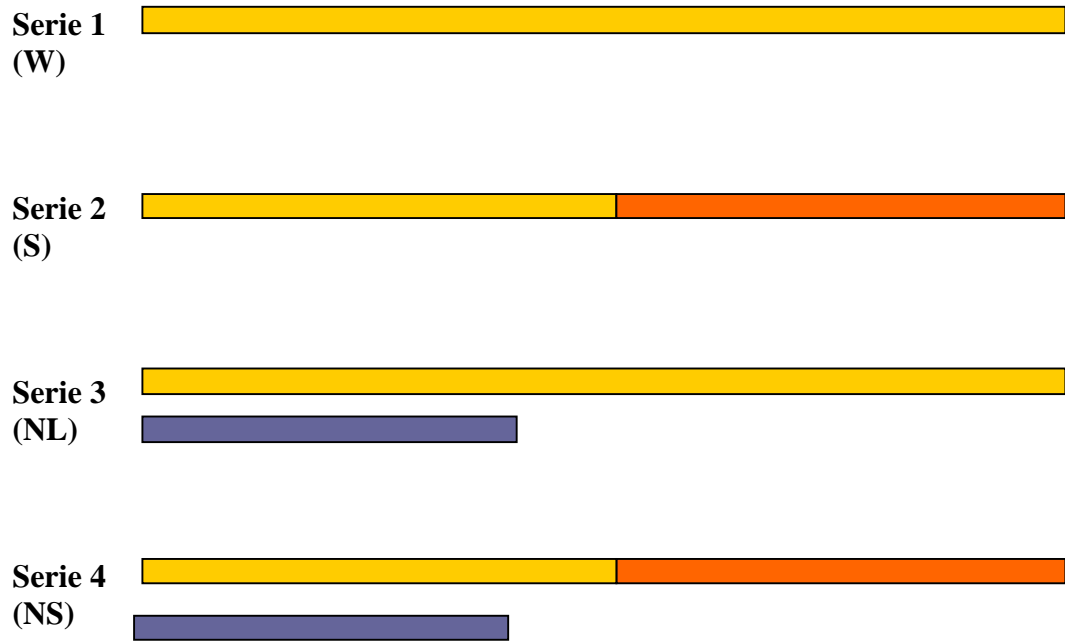
Serie 1: grupo control (W) sin bloqueo de la NOS. Recibieron agua de la llave y dieta normosódica ad libitum durante todo el experimento.

Serie 2: grupo con dieta hipersódica (S), que recibió pellet tratado con sal de mesa a una concentración de 4% las últimas cuatro semanas del experimento.

Serie 3: grupo L-NAME (NL), el que fue administrado en agua de la llave en una concentración de 700 mg/L (2.6 mM) (Quiroz y col., 2001) para así obtener una dosis de 116 mg/kg/día, esta solución se entregó a los animales durante las tres primeras semanas del experimento. Su dieta fue normosódica la totalidad del experimento.

Serie 4: grupo L-NAME y dieta hipersódica (NS), el L-NAME fue administrado al igual que la serie 3, luego con una semana de descanso. La dieta hipersódica es igual a la de la serie 2.

Protocolo de actividades según series.



Las fases experimentales incluyen:

- La inducción del daño túbulo intersticial.
- Un período en que se retira la noxa.(wash-out)
- Un período de manipulación en la ingesta de sal para así evidenciar la sal dependencia de la presión arterial.

Fase de inducción del daño túbulo intersticial:

Se utilizaron ratas de alrededor de 300 gr. las que recibieron L-NAME en el agua de bebida a una concentración de 2.6 mM, lo que permitió obtener una dosis diaria aproximada de 116 mg/Kg. Esta solución fue administrada durante 3 semanas a las series experimentales 3 y 4.

Fase de Washout:

Una vez finalizada la fase de inducción del daño y durante un período de 7 días, se suspendió la administración de L-NAME y los animales recibieron alimentación e hidratación normosódica.

Fase de manipulación de la ingesta de sal:

Esta fase fue planificada para 4 semanas y presentó diferencias para cada serie experimental en la cantidad de sal a recibir en la dieta, un grupo fue alimentado con dieta normosódica (series 1 y 3) que ingirieron pellet normosódico y bebieron agua de la llave y otro grupo con dieta hipersódica (series 2 y 4) que ingirieron pellet hipersódico y bebieron agua de la llave.

Preparación de la solución de L-NAME e inhibición de la síntesis de ON:

La solución de L-NAME se preparó disolviendo el reactivo en agua de la llave para llegar a una concentración final de 700 mg/L (2.6 mM) de solución para así obtener una dosis de 116 mg/kg/día. La solución fue renovada en forma diaria para las series correspondientes durante la fase de inducción del daño (3 semanas) y fue protegida de la luz ya que la solución de L-NAME es fotosensible.

Preparación de pellet hipersódico 4%:

El pellet normosódico contiene 87% de materia seca, 18.7% de proteína total, 5% de lípidos totales, 5.9% de fibra cruda, 6.74% de ceniza, 51% de extracto no nitrogenado; 13% de vitamina C y 0.4 % de sodio (Champion S.A., Stgo., Chile).

El pellet hipersódico se preparó con una solución de NaCl, la cual se agregaba al pellet normosódico para luego proceder a secarlo en estufa a una temperatura en la que se produjera la evaporación del solvente (agua) y la cristalización del NaCl en la superficie del pellet para así obtener una concentración de 4% p/p de pellet hipersódico.

Valoración del efecto hipertensivo de L-NAME y de la funcionalidad del sistema Calicreína-Cininas

Se evaluó el peso corporal, presión arterial, función renal, magnitud del daño túbulo intersticial, actividad enzimática urinaria de calicreína, tanto durante el desarrollo del experimento en algunos casos como al finalizar éste en otros.

Al inicio de cada período del experimento, en forma semanal durante cada fase y al finalizar cada período se hicieron las siguientes mediciones:

Peso corporal: el pesaje de las ratas se realizó cada vez que se inició el trabajo con cada una de ellas, para esto utilizamos una balanza Söehnle, con un rango de discriminación de 0.1 gramos. El peso se expresó en gramos.

Medición de la presión arterial: la presión arterial sistólica fue medida en la arteria caudal al nivel de la cola en animales conscientes utilizando un procedimiento no invasivo. Para esto utilizamos un esfigmomanómetro y un equipo de ultrasonido Doppler. El equipo Doppler permite medir la velocidad de la corriente sanguínea a través de señales que envía por un cristal ubicado en la punta del transductor. La frecuencia de la señal se modifica según la velocidad de la sangre, en los casos en que es más alto el tono del sonido, es mayor la velocidad del flujo de la sangre que se acerca o se aleja del transductor, y este cambio en la frecuencia se convierte en una señal audible y amplificada (Gallardo, 2001).

La toma de presión se hizo en un ambiente templado. Además los animales fueron puestos sobre una superficie temperada y la cola se comprimió en forma intermitente previa a la medición para así producir una adecuada vasodilatación por calor e hipoxia.

Se hicieron cinco registros cada vez y el promedio de estos valores se registró como la presión sistólica individual. Los valores son expresados en mm de Hg.

Recolección de orina de 24 horas: Para la recolección de orina se utilizaron contenedores identificados (jaulas metabólicas), con embudos provistos de filtro para evitar la contaminación con deposiciones, la orina fue tomada en un frasco de propileno identificado, los animales estaban en las jaulas durante 24 horas. Durante este periodo tuvieron acceso libre al agua pero no así al alimento, esto también se hizo para evitar contaminación por deposiciones. Luego de transcurridas 24 horas se midió el volumen de orina de cada rata y las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Nefrología del Hospital Regional de Valdivia.

esto se hizo para la determinación de proteinuria, creatininuria, electrolitos urinarios y calicreína urinaria.

Determinación de proteinuria: se realizó una determinación semicuantitativa de proteinuria usando tiras reactivas comerciales; la determinación cuantitativa fue realizada en autoanalizador Urinary/CSF Protein Roche Diagnostic por método turbidimétrico Iwata and Nishikaze modificado y fue expresada en mg de prot/mg de creatinina urinaria en 24 horas.

Determinación de creatinina: la creatinina fue medida por medio colorimétrico de Jaffé basado en que la creatinina reacciona con picrato alcalino en medio tamponado, previa desproteinización con ácido pícrico, obteniéndose un cromógeno que se mide a 510 nm. Para tal efecto se usó un espectrofotómetro Shimadzu ®.

Determinación de la actividad de calicreína urinaria: para la medición de la actividad enzimática de calicreína urinaria se utilizó el método enzimático amidásico de punto final (ver anexo 1). Se utiliza el sustrato sintético DL-Val-Leu-arginina-p-nitroanilide en presencia del inhibidor SBTI-EDTA (inhibidor Tripsínico de Soya + EDTA) que bloquea otras enzimas presentes en orina que presentan actividad similar a calicreína genera un producto cuya concentración es expresión de la actividad enzimática de la muestra y que es medible colorimétricamente en un espectrofotómetro a 405 nm. La reacción fue realizada en duplicado y leída contra un blanco.

Con la finalidad de eliminar las diferencia en las diuresis, los valores fueron corregidos dividiéndolos por la concentración de creatinina urinaria y están expresados como mU calicreína/mg creatinina en 24 horas.

Al término del estudio todos los animales fueron sacrificados bajo anestesia general etérea, se recolectó la sangre por punción cardiaca y se extrajeron ambos riñones, los que posterior a lavado con solución fisiológica se guardaron en una porción fresca congelada, otro en porción fijada en formaldehído al 4%, otra en Bouin y otra en fijador de Karnowsky para microscopía electrónica.

Evaluación histológica de las lesiones tubulointersticiales: la severidad de la dilatación tubular, artrofia y grado de infiltración celular fue evaluada en cortes de tejido renal utilizando la escala de Zoja. En donde 0 corresponde a cambios en menos del 10% de la superficie del corte; 1+ cambios en el 25% de la sección; 2+ cambios en el 50% de la sección; 3+ cambios en el 75% de la sección y 4+ cambios en un área mayor al 75% de la superficie. La totalidad de la región cortical fue examinada por dos observadores y el promedio obtenido en cada sección fue usado como “el puntaje TI”.

Análisis estadístico: un programa estadístico comercial (GraphPad InStat®, versión 3.01 para Windows 95/NT, San Diego CA, USA) fue utilizado para estos análisis. Los valores fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. Se utilizó como nivel de significancia $p < 0.05$. Para analizar las posibles diferencias entre dos grupos, y considerando el pequeño número de sujetos por grupo, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney y para análisis intraserie se utilizó el análisis de varianza no paramétrico Wilcoxon.

RESULTADOS

PESO CORPORAL.

La evaluación de los datos obtenidos en las diferentes etapas del experimento mostró un incremento gradual de peso a lo largo del experimento para cada una de las series experimentales.

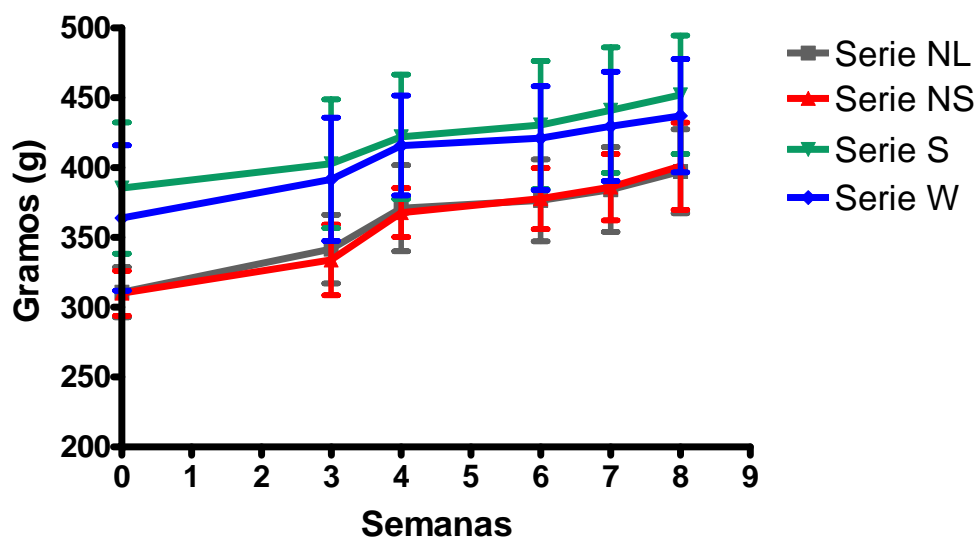


Gráfico n° 1 Peso corporal promedio (PCP) y su desviación estándar (DE), para las series en estudio durante los días de medición de presión arterial del experimento expresado en gramos.

Tabla n° 1 Peso corporal promedio (PCP) y su desviación estándar (DE), para las series en estudio durante los días de medición de presión arterial del experimento expresado en gramos.

	W	NL	NS	S
Basal	363.9 ± 52.0	310.7 ± 18.0	310.0 ± 16.1	385.4 ± 47.0
Semana 3	391.6 ± 44.1	341.7 ± 24.6	333.9 ± 25.4	402.8 ± 46.1
(fin inducción)				
Semana 4	415.8 ± 35.7	370.9 ± 30.9	367.8 ± 17.6 *	422.1 ± 44.5
(fin WO)				
Semana 6	421.1 ± 37.2	376.6 ± 29.3	377.8 ± 21.9	430.5 ± 45.9
Semana 7	429.6 ± 39.2	384.3 ± 30.4	386.0 ± 23.7	441.1 ± 44.9
Semana 8	437.1 ± 40.6	397.3 ± 30.1	401.0 ± 31.2	452.1 ± 42.4

* $p < 0.05$ (vs serie control)

Tabla n° 2 Peso corporal promedio (PCP) para las series en estudio durante los controles basal y de la semana 8 del experimento.

Serie	Basal	Semana 8
NL	310.7 ± 18.0	397.3 ± 30.1*
NS	310.0 ± 16.1	401.0 ± 31.2*
S	385.4 ± 47.0	452.1 ± 42.4
W	363.9 ± 52.0	437.1 ± 40.6*

*p < 0.05 (vs serie basal)

Cada uno de los series a excepción de la serie S mostró un aumento significativo de peso desde el control basal al control realizado en la semana 8 del experimento, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$) al analizar cada una de las series por separado.

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA.

Análisis interserie. Se comparó la presión arterial sistólica promedio (PASP) de cada serie en las diferentes etapas del experimento.

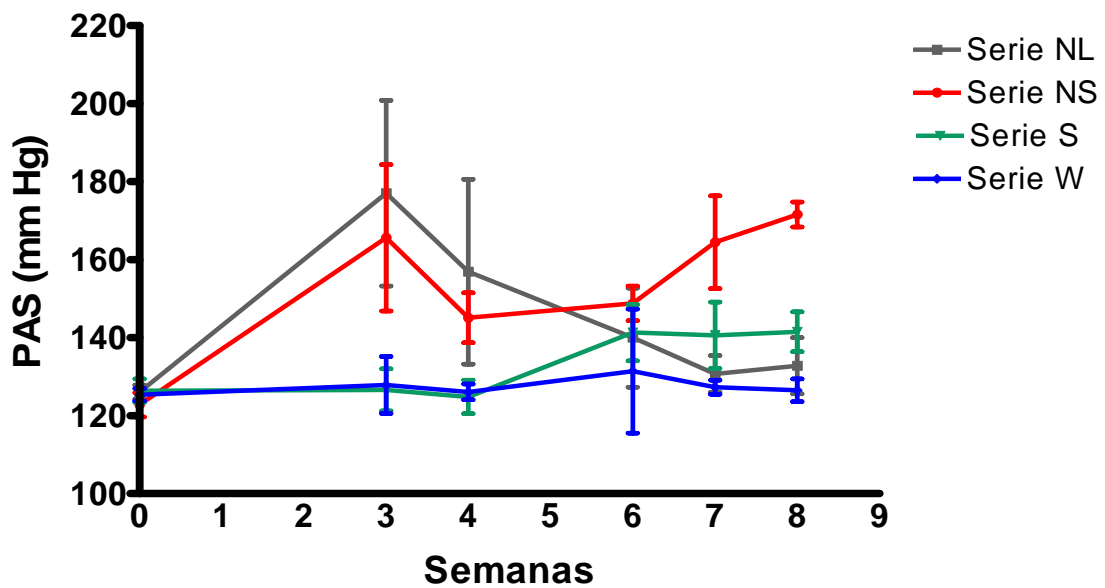


Gráfico n° 2 Presión arterial sistólica promedio (PASP) en ratas control (W), en ratas tratadas con dieta hipersódica (S), tratadas con L-NAME (NL) y con L-NAME más dieta hipersódica (NS).

Tabla n° 3. Presión arterial sistólica promedio (PASP) y su desviación estándar (DE), para las series en estudio expresado en mm Hg.

Controles	W	NL	NS	S
Basal	125.4 ± 1.6	126.1 ± 1.8	122.8 ± 3.1 [#]	126.4 ± 3.0
Semana 3	127.9 ± 7.3	177.0 ± 23.8*	165.6 ± 18.8*	126.6 ± 5.4
(Fin inducción)				
Semana 4	126.1 ± 2.0	156.9 ± 23.7*	145.1 ± 6.4*	124.8 ± 4.3
(Fin WO)				
Semana 6	131.4 ± 15.9	140.0 ± 12.7*	148.8 ± 4.4*	141.3 ± 7.2*,@
Semana 7	127.3 ± 1.8	130.7 ± 4.7	164.5 ± 11.9*,#	140.6 ± 8.5*,@
Semana 8	126.5 ± 2.9	132.8 ± 7.2*	171.6 ± 3.2*,#	141.5 ± 5.1*,@

* p < 0.05 (vs serie W)

[#] p < 0.05 (vs serie NL)

@ p < 0.05 (vs serie NS)

Análisis intraserie. Se comparó la presión arterial sistólica promedio (PASP), considerando todo el período experimental dentro de cada serie en estudio.

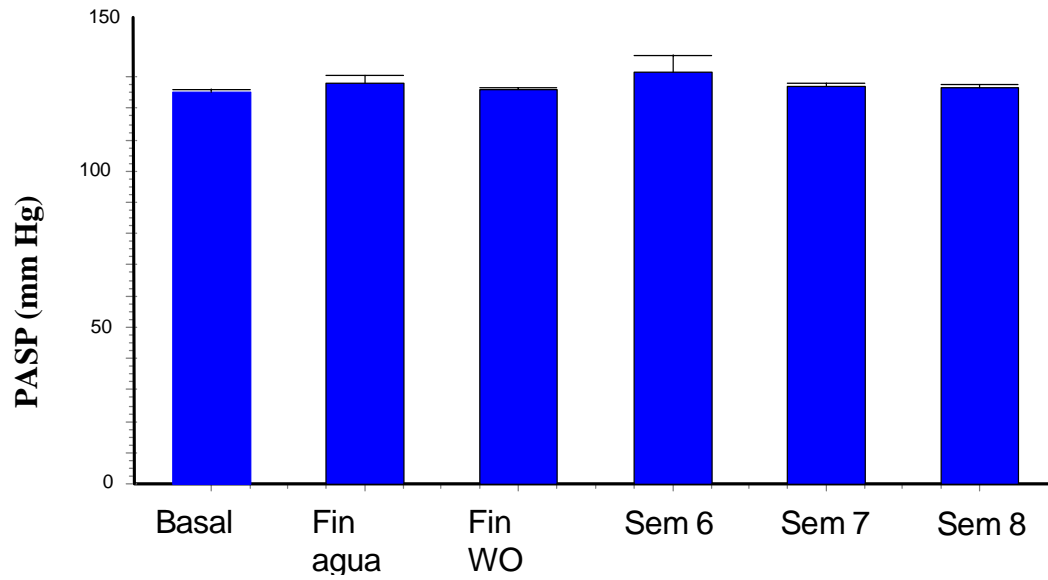
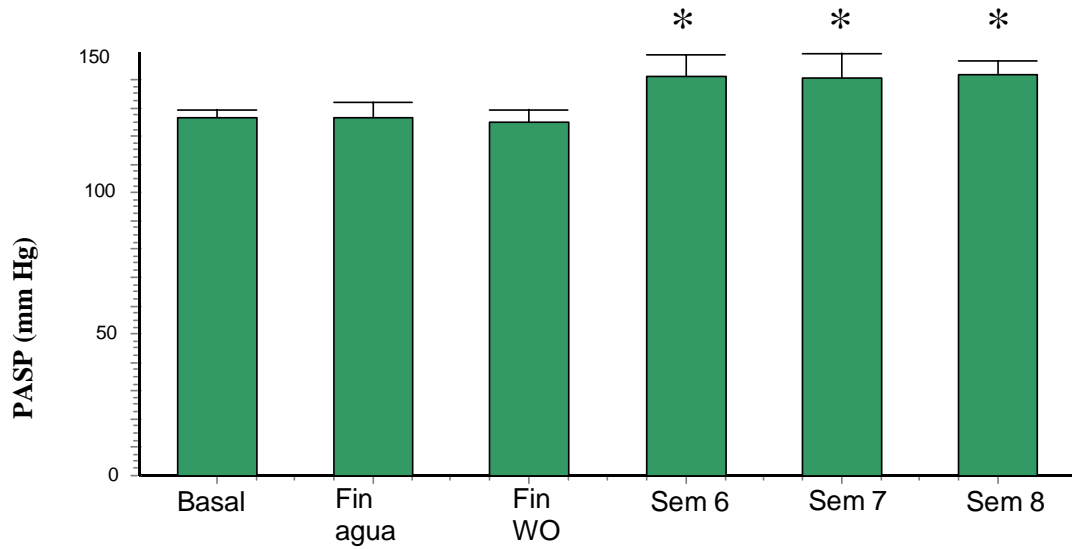


Gráfico n° 3. Presión arterial sistólica promedio \pm DE de 8 ratas de la serie control (W) obtenidas semanalmente durante un período experimental de 8 semanas ($p > 0.05$).

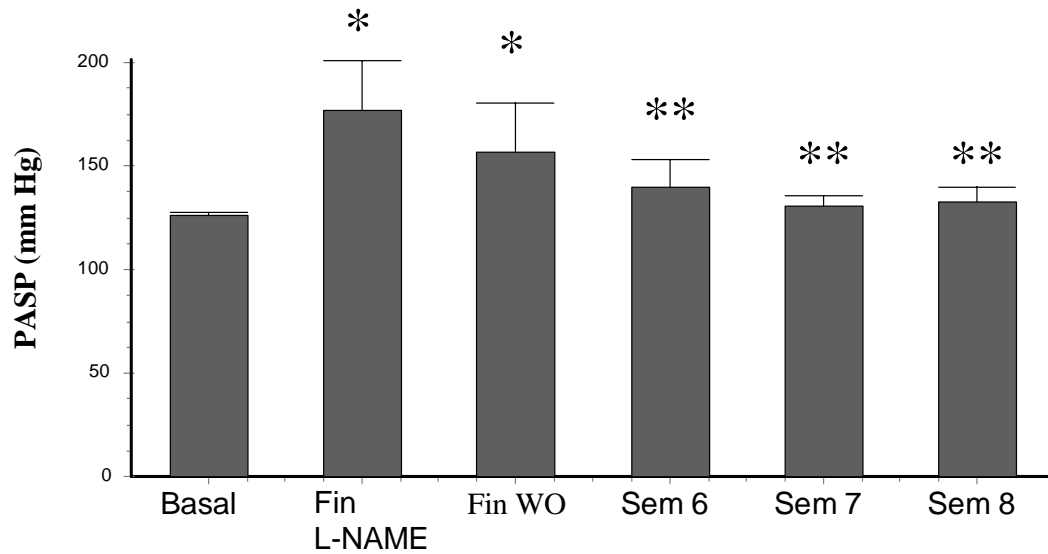
La serie S evidenció una elevación de la presión arterial a partir de la sexta semana del experimento, aumento que se mantuvo durante el resto del experimento.



* $p < 0.05$ (vs control basal)

Gráfico n° 4. Presión arterial sistólica promedio \pm DE de 8 ratas de la serie con dieta hipersódica (S) obtenidas semanalmente durante un período experimental de 8 semanas.

La serie NL evidenció una elevación de la presión arterial a partir de la tercera semana (fin L-NAME) del experimento, aumento que fue disminuyendo durante el resto del experimento, hasta estabilizarse a la octava semana. Se observaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre el control basal y el fin del L-NAME.

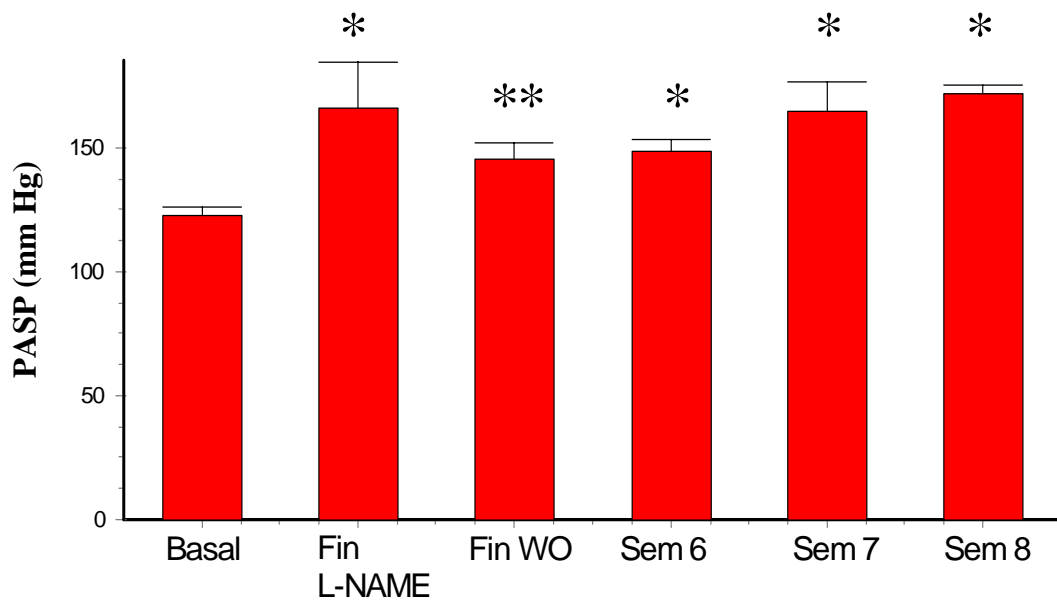


* $p < 0.05$ (vs control basal)

** $p < 0.05$ (vs control basal y fin L-NAME)

Gráfico n° 5. Presión arterial sistólica promedio \pm DE de 9 ratas de la serie tratada con L-NAME (NL) obtenidas semanalmente durante un período experimental de 8 semanas.

La serie NS evidenció una elevación de la presión arterial a partir de la tercera semana (fin L-NAME) del experimento, aumento que disminuyó al fin del wash out, pero que volvió a incrementar a medida que se avanzaba en las semanas siguientes en que se aumentó la cantidad de sodio en la dieta de los animales experimentales. Se observaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre el control basal y el fin del L-NAME.



* $p < 0.05$ (vs control basal)

** $p < 0.05$ (vs control basal y fin L-NAME)

Gráfico n° 6. Presión arterial sistólica promedio \pm DE de 8 ratas de la serie tratada con L-NAME (NL) y dieta hipersódica obtenidas semanalmente durante un período experimental de 8 semanas.

PROTEINURIA

Se comparó la proteinuria de cada una de las series en las diferentes etapas del experimento.

Tabla nº 4. Proteinuria promedio y su desviación estándar (DE), para las series en estudio expresado en miligramos de proteínas por miligramos de creatinina en 24 horas.

	W	NL	NS	S
Controles	mg Prot/mg Creat/24 h	mg Prot/mg Creat/24 h	mg Prot/mg Creat/24 h	mg Prot/mg Creat/24 h
Basal	5.59 ± 1.60	5.95 ± 1.29	7.07 ± 6.81	4.94 ± 1.16
Semana 3	4.61 ± 1.35	2287.3 ± 3590.0*	336.52 ± 463.71*	4.37 ± 1.89
(Fin inducción)				
Semana 4	2.41 ± 1.14	6.89 ± 3.61*	4.42 ± 2.11*	2.91 ± 0.70
(Fin WO)				
Semana 6	3.67 ± 1.15	7.53 ± 3.16*	5.53 ± 3.00	6.16 ± 2.75*
Semana 7	3.87 ± 1.04	4.81 ± 2.15	3.84 ± 2.08	7.79 ± 3.73* [#]
Semana 8	4.63 ± 6.04	4.01 ± 2.52	3.82 ± 2.23	6.13 ± 1.53* [#]

* p < 0.05 (vs serie W)

p < 0.05 (vs serie NS)

DAÑO TUBULOINTERSTICIAL

Se evaluó el daño tubulointersticial (TI) de las muestras renales obtenidas al momento del sacrificio.

Tabla n° 5. Score de daño túbulointersticial de la serie control (W) versus las series NL, NS y S, según escala de Zoja.

Daño TI serie W	Daño TI serie NL	Daño TI serie NS	Daño TI serie S
0 ± 0	0.14 ± 0.00	0.35 ± 0.20	0 ± 0

Se presentó daño túbulointersticial sólo en las series tratadas con L-NAME

ACTIVIDAD DE CALICREINA URINARIA

Análisis interserie

La actividad de calicreína urinaria no presentó diferencias ($p>0.05$) durante los tres controles realizados para las series NL y NS (basal, fin L-NANE y semana 8).

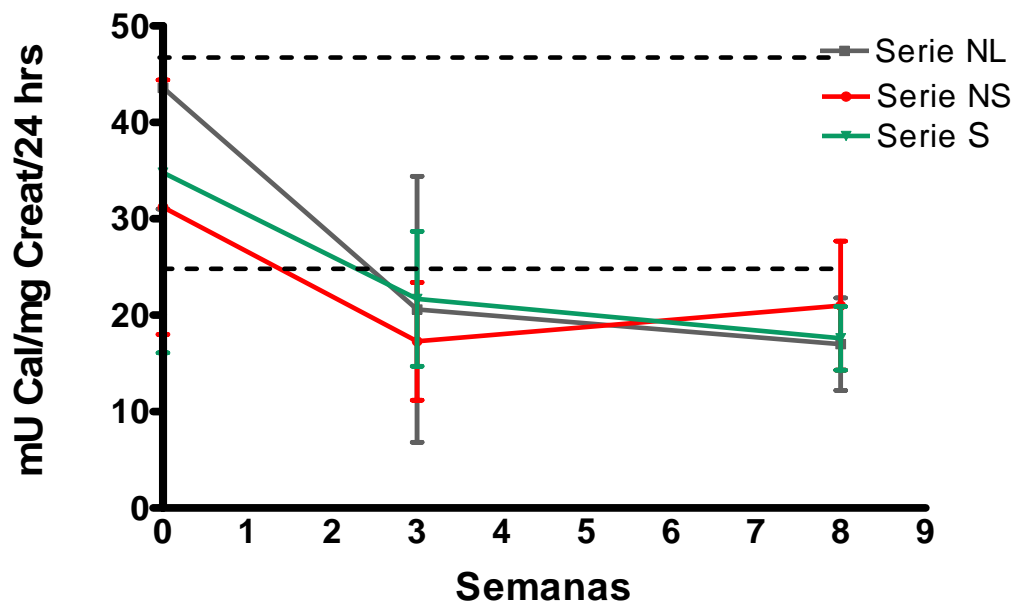
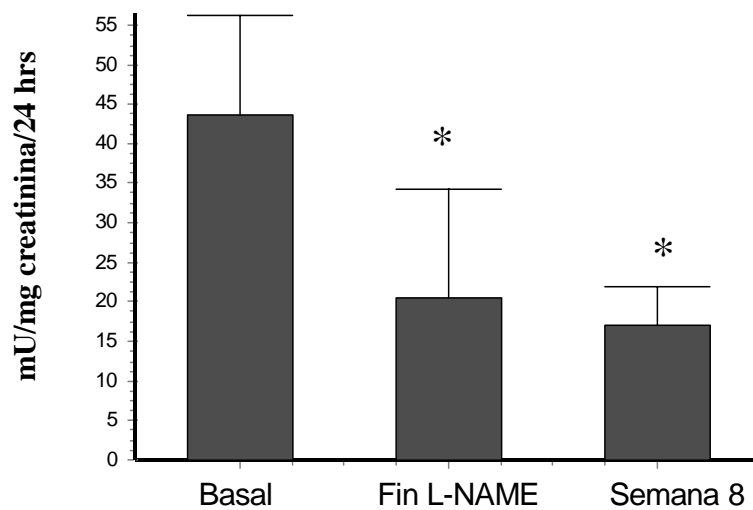


Gráfico n° 7 Actividad de Calicreína urinaria en ratas control (W), en ratas tratadas con dieta hipersódica (S), tratadas con L-NAME (NL) y con L-NAME más dieta hipersódica (NS), expresado en miliunidades por miligramos de creatinina en 24 horas (mU/mg creatinina/24 hrs), línea punteada indica rango de normalidad para ratas control sanas (equivalente a serie W)

Análisis intraserie

A continuación se detalla el análisis estadístico intraserie en el cual se compararon los valores obtenidos en las series NL y NS en los tres controles de calicreína urinaria realizados.

Se puede observar para la serie NL una disminución en los valores de calicreína urinaria en el control al finalizar la administración de L-NAME, resultados que son significativos ($p < 0.05$). Esta disminución se mantiene la última semana siendo no significativa con respecto al segundo control.



* $p < 0.05$ (vs control basal)

Gráfico n° 8 Actividad enzimática de calicreína urinaria promedio expresado en miliunidades por miligramos de creatinina en 24 horas (mU/mg creatinina/24 hrs) con su desviación estándar (DE) para la serie NL.

Se puede observar para la serie NS una disminución en los valores de caliceína urinaria en el control al finalizar la administración de L-NAME, resultados que son no significativos ($p>0.05$) para ninguna de las etapas.

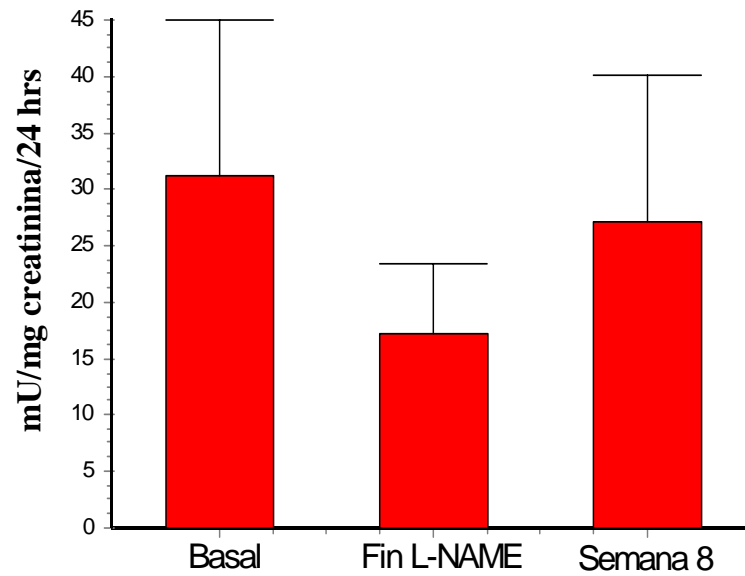


Gráfico nº 9 Actividad enzimática de caliceína urinaria promedio expresado en miliunidades por miligramos de creatinina en 24 horas (mU/mg creatinina/24 hrs) con su desviación estándar (DE) para la serie NS.

ELECTROLITOS URINARIOS

EXCRECIÓN DE SODIO URINARIO

Se analizaron las variaciones en la excreción de sodio urinario, observándose oscilaciones en las distintas etapas del experimento.

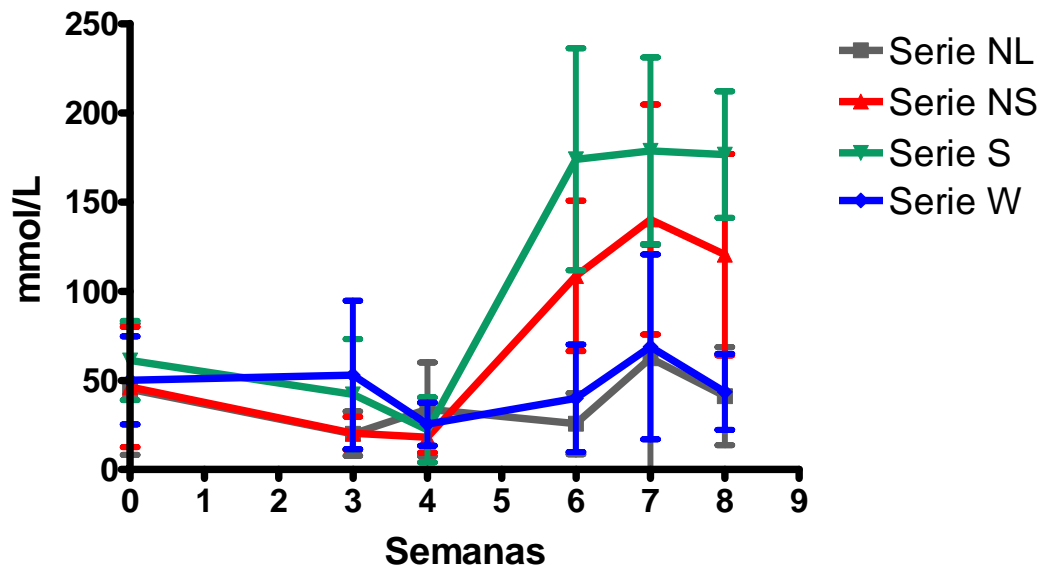


Gráfico n° 10 Excreción de sodio urinario y su desviación estándar (DE), para las series en estudio durante los días de toma de muestras de orina. Expresado en milimoles por litro (mmol/L).

Tabla n° 6. Datos de sodio urinario de la serie control (W) versus las series NL, NS y S en cada control.

	W	NL	NS	S
Control	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
Basal	50.0 ± 24.7	45.1 ± 36.8	46.3 ± 33.7	61.1 ± 22.2
Semana 3	53.0 ± 41.6	20.1 ± 12.4*	20.4 ± 9.3*	42.2 ± 30.9
(Fin inducción)				
Semana 4	25.5 ± 12.1	33.8 ± 8.6	18.1 ± 26.3	22.3 ± 18.2
(Fin WO)				
Semana 6	39.9 ± 30.1	25.7 ± 17.1	108.6 ± 42.1*[#]	174.0 ± 62.2*
Semana 7	68.8 ± 51.8	62.4 ± 63.6	140.2 ± 65.5*[#]	178.7 ± 52.3*
Semana 8	43.6 ± 21.3	41.2 ± 27.5	120.5 ± 56.5*[#]	176.6 ± 35.4*

* p < 0.05 (vs serie W)

p < 0.05 (vs serie NL)

EXCRECIÓN DE POTASIO URINARIO

Se analizaron las variaciones en la excreción de potasio urinario para cada serie experimental.

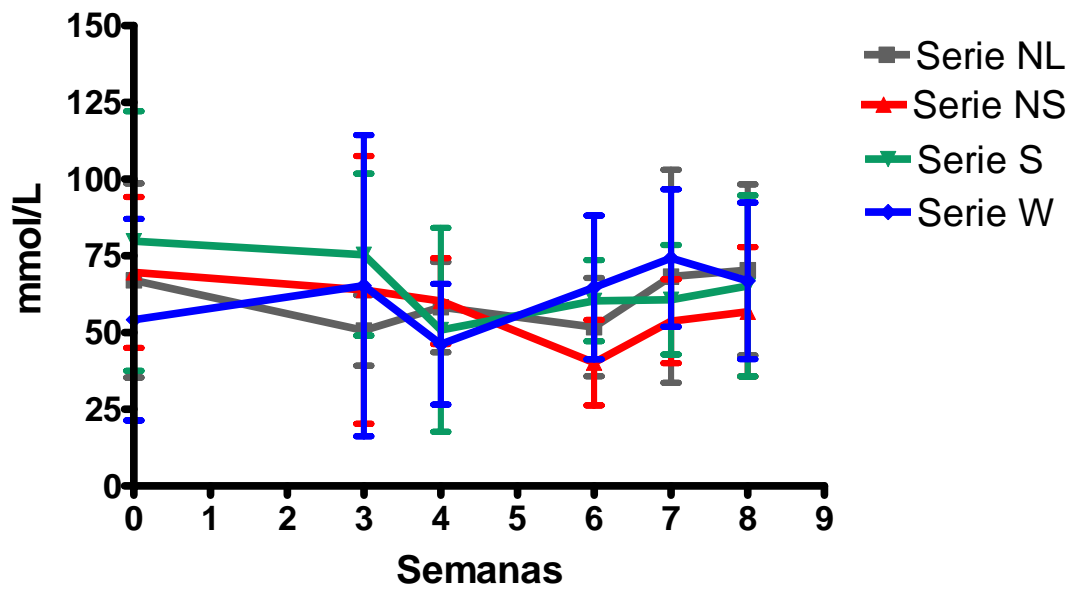


Gráfico n° 11 Excreción de potasio urinario y su desviación estándar (DE), para las series en estudio durante los días de toma de muestras de orina. Expresado en milimoles por litro (mmol/L).

Tabla n° 7. Datos de potasio urinario de la serie control (W) versus las series NL, NS y S en cada control.

	W	NL	NS	S
Controles	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
Basal	54.2 ± 32.8	67.0 ± 31.6	69.6 ± 24.6	79.8 ± 42.3
Semana 3	65.3 ± 49.1	50.7 ± 11.5	63.9 ± 43.6	75.4 ± 26.4
(Fin inducción				
Semana 4	46.2 ± 19.7	58.3 ± 14.7	60.3 ± 14.0	50.9 ± 33.2
(Fin WO)				
Semana 6	64.7 ± 23.4	51.8 ± 16.0	40.2 ± 13.9	60.4 ± 13.2
Semana 7	74.3 ± 22.4	68.3 ± 34.7	53.7 ± 13.7	60.7 ± 17.8
Semana 8	66.9 ± 25.5	70.4 ± 56.8	56.8 ± 21.1	65.2 ± 29.5

EXCRECIÓN DE CLORURO URINARIO

Se analizaron las variaciones en la excreción de cloruro urinario, observándose oscilaciones en las distintas etapas del experimento.

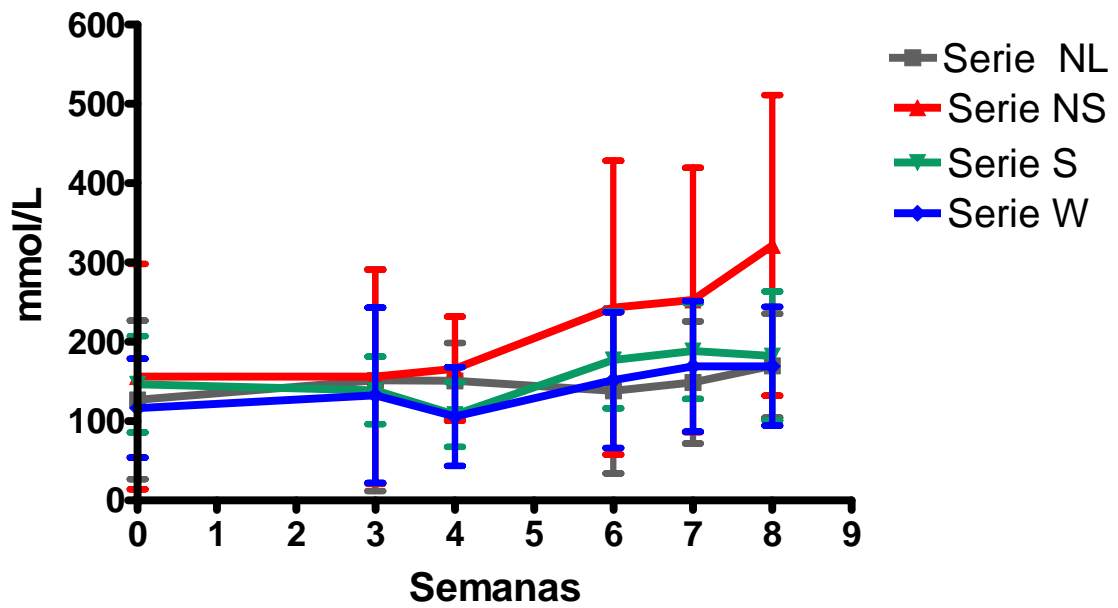


Gráfico n° 12 Excreción de cloruro urinario y su desviación estándar (DE), para las series en estudio durante los días de toma de muestras de orina. Expresado en milimoles por litro (mmol/L).

Tabla n° 8. Datos de cloruro urinario de la serie control (W) versus las series NL, NS y S en cada control.

	W	NL	NS	S
Controles	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
Basal	116.5 ± 62.3	126.8 ± 100.1	156.2 ± 142.1	146.5 ± 60.7
Semana 3	132.6 ± 110.4	151.6 ± 139.8	156.1 ± 134.8	138.7 ± 42.7
(Fin inducción				
Semana 4	105.9 ± 62.3	150.7 ± 47.9	166.1 ± 65.6	108.3 ± 40.8
(Fin WO)				
Semana 6	151.8 ± 85.8	138.0 ± 104.0	243.2 ± 185.4	177.2 ± 61.0
Semana 7	169.2 ± 82.4	148.9 ± 76.9	252.8 ± 166.7	188.5 ± 60.2
Semana 8	169.3 ± 74.7	169.9 ± 65.5	321.5 ± 189.5*	182.1 ± 81.4

* p < 0.05 (vs serie W)

DISCUSIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es probablemente el problema de salud pública más importante de los países desarrollados, debido a que es causante de morbilidad cardiovascular y gravitante en la enfermedad cerebrovascular. (Antri, 2004)

En la comprensión del trasfondo fisiopatológico de la HTA, la mayor dificultad para descubrir los mecanismos implicados en la génesis de esta patología se atribuye a la variedad de sistemas implicados en su regulación y a la complejidad de las interacciones entre ellos.

Gran cantidad de evidencia respalda la idea que el riñón juega un papel importante en el control de la presión sanguínea debido a que posee sistemas vasoconstrictores como es el sistema Renina-Angiotensina (SRA) y vasodilatadores como son el SCC y el NO, siendo responsable de la mantención del balance de agua y sodio, preservando el volumen sanguíneo y un adecuado tono vascular. (Lombardi y col., 1999, Ojeda, 2004)

La hipertensión arterial esencial es frecuentemente iniciada por una hiperactividad del sistema nervioso simpático (SNS), por razones genéticas o ambientales, a lo que le sigue la activación del SRA y una capacidad disminuida en la natriuresis por presión. El riñón responde a esta elevación de la presión por mecanismos de autorregulación en los cuales la arteriola aferente y la arteria interlobular se vasocontraen en un intento de prevenir la transmisión de presión a las estructuras sensibles (glomérulos y capilares peritubulares). Ocurre entonces el daño renal como consecuencia de una regulación imperfecta que daña las estructuras sensibles del riñón y dependiente de la isquemia producida la que induce inflamación tubulointersticial, activa el SRA y daña las estructuras vasodilatadoras del riñón haciéndolo sal sensible. (Mountokalakis, 1997)

El modelo de inhibición crónica de la síntesis de (NO) induce vasoconstricción renal y con esto injuria renal microvascular y tubulointersticial lo que lleva a la inflamación renal, efecto esperado por la función conocida del NO como agente endógeno antiinflamatorio por

inhibir la proliferación celular, adhesión de leucocitos, expresión de adhesión de moléculas y adhesión plaquetaria. La inflamación se considera como un elemento inseparable de daño, jugando un rol importante en la patogénesis de nefropatías progresivas de origen no inmune. De modo que no sólo se produce una elevación de la presión arterial sino que también un daño vascular y parenquimatoso del riñón. Por lo tanto, a través de la administración de L-NAME se genera daño en el tejido tubulointersticial del riñón y es probable que éste sea el mecanismo de daño al sistema Calicreína-Cininas observado en este modelo.

Al realizar un análisis comparativo entre las series en estudio se observó que cada uno de los grupos mostró un aumento significativo de peso desde el control basal al control realizado en la semana 8 del experimento. La serie S aumentó su masa corporal en un 17% lo que no alcanzó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control basal, esto puede explicarse porque este grupo de animales comenzó el experimento con un peso promedio mayor y con más de doce semanas de edad a diferencia de las otras series en estudio. El normal aumento de peso observado nos permite afirmar que esta cepa presenta una buena tolerancia a las noxas utilizadas en este modelo experimental.

Todos los grupos experimentales mostraron ser normotensos en el control basal, situación en la que los animales estaban recibiendo alimento y agua ad libitum y no habían sido expuestos a la administración de L-NAME. Se observaron diferencias significativas entre la serie control normal (W) y la serie S a partir de la sexta semana del experimento y diferencias entre la serie control (W) con respecto a las series NL y NS las semanas 3, 4, 6, 7 (solo para la serie NS) y 8 del experimento. Esto debido a que al inhibirse la producción de NO, se inhibe su rol de regulador fisiológico del tono vascular y hemodinámica renal, al administrar L-NAME la resistencia vascular y la PA son incrementados, la administración de L-NAME produce una hipertensión dosis y tiempo dependiente y puede llevar al desarrollo de

hipertensión maligna con aumento en los valores de PA al aumentar la cantidad de sodio en la dieta.

Se observaron diferencias a la tercera semana del experimento (fin inducción), entre la serie control y las series tratadas con L-NAME, diferencias que se mantuvieron hasta la semana 6 para la serie NL y durante el resto del experimento para la serie NS, este aumento en los valores de PAS durante el período de inducción y de descanso (W.O.) estaría dado por el efecto de la administración de L-NAME que, al inhibir la síntesis del NO, inhibe su efecto vasodilatador con el predominio de sustancias vasoconstrictoras. El análisis de los valores de PAS durante las semanas posteriores a la etapa de inducción se enfocó a observar si existieron diferencias significativas entre las series una vez comenzado el aumento en la ingesta de sal. Observamos que para la serie NL, la cual recibió pellet normosódico, los valores de PAS fueron decayendo a partir de la tercera semana hasta llegar a valores comparables a los del grupo control, no así para las series que una vez finalizado el período de descanso recibieron una dieta rica en sal (NS y S), las que mostraron un aumento significativo en sus valores de PAS con respecto al control y que se mantuvieron hasta el final del experimento.

Al analizar las series tratadas con L-NAME (NL y NS) podemos observar un marcado aumento en los valores de PAS para la serie NS a partir de la sexta semana con respecto a la serie NL, diferencias que fueron significativas para las semanas 7 y 8.

Al realizar el análisis intraserie se puede observar que en la serie W se presentaron valores de PAS que fluctuaron entre los 125.4 ± 1.6 y los 131.4 ± 15.9 , no observándose variaciones significativas durante el período experimental.

En la serie S se puede evidenciar un aumento de la PAS a partir de la sexta semana del experimento, aumento que se mantuvo durante el resto del período de observación, mostrando diferencias significativas entre su control basal y el registrado a las semanas 6 y 8. Este es un hecho bastante interesante ya que aunque los valores de PAS fueron menores que los del

grupo NS, fueron significativamente mayores que las cifras obtenidas por el grupo control. Esta relativa “sal sensibilidad” ha sido descrita previamente en ratas Sprague-Dawley recién nacidas por otros autores (Swenson y col, 2004)

Para la serie NL podemos observar un aumento significativo en los valores de PAS, cuyo valor máximo se presentó a la tercera semana de iniciado el experimento (fin de la inducción) hecho que ha sido comunicado en numerosos experimentos previos y con diferentes dosis de L-NAME, en estos experimentos se ha visto que altas dosis de L-NAME produce una inmediata vasoconstricción y la hipertensión resultante podría aumentar por la ingesta alta de sal. Los efectos dosis dependiente de infusiones intravenosas de L-NAME fueron estudiados en ratas para observar las alteraciones producidas en la función renal y si estas alteraciones estaban relacionadas con un aumento de la PA, se trataron con infusiones desde 1 hasta 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ se observó que la administración de dosis de 10 hasta 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ producen un marcado incremento de los valores de PA. Estos resultados sugieren que la disminución en la producción de NO al administrar L-NAME afecta la excreción renal de sodio y agua en la ausencia de cualquier cambio en la PA. Dosis altas de L-NAME también producen HTA que se relaciona con el efecto antinatriurético. (Lahera y col., 1997; Qiu y col., 1998) A partir de la semana cuatro (fin W.O.) se registró una disminución en los valores de PAS llegando a valores comparables con el grupo control para la semana 8.

En la serie NS se presentaron valores elevados de PAS al finalizar la inducción con L-NAME, valores que disminuyeron al finalizar el período de descanso, esto debido a que la administración de L-NAME produce una HTA dosis y tiempo dependiente, por lo que al dejar de administrar el inhibidor de la síntesis de NO en el período de descanso se puede observar que los valores de PA tienden a bajar en forma considerable. (Qiu y col., 1998) Se observó que nuevamente aumentaron los valores de PA al exponer al grupo a una dieta rica en sal, es

por esto que se puede observar un aumento gradual de los valores de PAS hasta el final del experimento, lo que nos confirma la aparición de HTA sal sensible.

Todos los grupos experimentales mostraron valores basales menores a 8 mg de proteínas/mg de Creatinina/24horas. Sin embargo, durante la fase de inducción de daño por L-NAME se produjo intensa proteinuria en los grupos de ratas NL y NS, hecho que ha sido informado en estudios realizados con este modelo, en esos estudios se pudo observar que al aumentar los valores de PA por la administración de L-NAME también se ha visto un aumento en la resistencia vascular renal y el desarrollo de proteinuria, la tasa de filtración glomerular baja coincidiendo todo esto con la aparición de daño renal. (Qiu y col., 1998) Luego de las dos semanas de descanso ambos grupos se recuperaron y llegaron a valores comparables a los grupos que no fueron tratados con L-NAME, tendencia que se mantuvo durante el transcurso de las semanas siguientes, esto se puede deber al rol del NO en la regulación de la funciones del riñón, una inhibición aguda de la NOS con análogos de la L-Arginina produce una vasoconstricción renal intensa con una marcada reducción del flujo plasmático renal y una pequeña disminución en la tasa de filtración glomerular.(Zatz y Baylis, 1998) En otros estudios Zatz y col., mostraron que la inhibición aguda de la NOS lleva a una vasoconstricción tanto en la arteriola aferente como eferente, vasoconstricción que lleva a un incremento en la presión sanguínea glomerular, hecho que disminuye al interrumpir la administración del inhibidor de la síntesis de NO.

Se encontraron diferencias significativas en la comparación de los grupos NL y NS versus el grupo W en las semanas tres y cuatro, al finalizar el daño por L-NAME y al finalizar las dos semanas de descanso respectivamente. Esta diferencia significativa se puede observar para la serie NL en la semana seis. Esto se debe a que la inhibición crónica de la NOS produce un bloqueo de NO, además reduce la tasa de filtración glomerular, disminuye la excreción de sodio urinario y produce un incremento de la actividad de renina plasmática lo

que produce una hipertensión arterial progresiva asociado a proteinuria y a un severo daño vascular, intersticial y glomerular en el riñón. (Steven y col., 1997)

Hubo diferencias significativas entre la serie W y la serie S durante las tres últimas semanas del experimento, tiempo en el cual se aumentó la cantidad de sodio en la dieta de esta serie.

Para las dos series experimentales tratadas con L-NAME (NL y NS) se observó un incremento significativo de los valores de proteinuria urinaria en el período en que ocurría el daño renal, no siendo significativos entre sí. A partir de la sexta semana (fin Wash Out) estos valores de proteína urinaria tienden a normalizarse hasta llegar a valores equitativos a los del grupo control, durante este período no se observó diferencia significativa entre las series NL y NS.

La inhibición crónica de la NOS produce un bloqueo de NO, además reduce la tasa de filtración glomerular, disminuye la excreción de sodio urinario y produce un incremento de la actividad de renina plasmática lo que produce una hipertensión arterial progresiva asociado a proteinuria y a un severo daño vascular, intersticial y glomerular en el riñón. (Campbell, 2006)

Al hacer un análisis de los cortes histológicos de riñón obtenidos al momento del sacrificio podemos observar que aquellas series que no fueron tratadas con L-NAME no presentaron daño tubulointersticial lo que concuerda con los valores de PAS obtenidos para estas series quienes no presentan inhibición del NO. En cambio las series tratadas con el inhibidor de la síntesis de NO presentaron daño tubulointersticial, datos que no fueron significativos al compararlos con los del grupo control, al relacionar estos datos obtenidos al analizar los cortes histológicos con los valores de calicreína urinaria de las series tratadas con L-NAME, podemos ver que existe una disminución en la expresión de ésta para aquellas series que sufrieron daño renal, hecho que nos indica que la inhibición del NO afectó al SCC.

Hecho que se explicaría ya que la inhibición crónica del NO intensifica la adhesión y migración leucocitaria, la expresión de moléculas de adhesión y colágeno tipo I, en consecuencia estimula la proliferación celular e infiltración macrofágica, por lo tanto la inhibición crónica del NO puede favorecer al desarrollo de inflamación renal. (Fuhijara y col., 2001) El bloqueo del NO entonces está asociado con el desarrollo de injuria renal local, caracterizada por glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial, lesión arterial y arteriolar e infiltración celular en áreas tubulointersticiales del riñón. (Quiroz y col., 2001)

Debido a que la aparición de HTA y la disminución en la actividad urinaria de calicreína aparecen en el contexto de estudios realizados con inhibidores de la síntesis de NO y daño TI, y considerando que el SCC se localiza a nivel tubular, es lógico pensar que el daño al SCC puede comprometer su rol regulador de la presión arterial y colaborar con la patogénesis de la sal sensibilidad que sigue a este modelo.

Extensos estudios epidemiológicos han documentado una relación inversa entre los niveles de calicreína urinaria y elevación de la PA en pacientes hipertensos. Puesto que la calicreína se origina en el riñón sus niveles decrecen con el deterioro de la función renal. (Chao y col., 1997)

Al realizar un análisis comparativo de la calicreína urinaria entre las series que fueron tratadas con L-NAME se observó que no hubieron diferencias significativas entre los controles realizados, aunque a la tercera semana (fin inducción) se produjo una disminución considerable de los valores de calicreína urinaria que permanecieron en el último control al momento del sacrificio, hecho relacionado al daño producido al SCC por el daño TI inducido con la inhibición de la producción de NO.

El análisis comparativo intraserie muestra que la serie NL presentó una marcada disminución en los valores de calicreína diferencia que fue significativa con respecto al control basal, esta disminución se relaciona con el aumento en los valores de PAS al finalizar

el periodo de inducción y que se relaciona además al encontrarse daño TI en las muestras renales. Esta disminución en la actividad de caliceína se puede observar además en el último control, lo que es concordante con nuestra hipótesis, por la que la administración de L-NAME produce daño renal con el consiguiente daño al SCC.

Los resultados del análisis intraserie para el grupo NS son semejantes a los encontrados en el grupo NL debido a que este grupo también recibió L-NAME durante el período de inducción, produciéndose una marcada disminución en los valores de caliceína lo que nos indica que el daño producido al sistema ya ocurre durante la inducción. Sin embargo tras el periodo de descanso, se puede ver un incremento en los valores de caliceína para esta serie al finalizar el experimento, una vez que recibieron la dieta rica en sal, el que sin embargo no llegó a ser comparable a los obtenidos en el control basal. El aumento podría ser explicado por la ingesta aumentada de sal y la activación del tejido que no sufrió daño, ya que se ha observado que existe una correlación positiva entre sodio urinario, agua y caliceína en ratas que recibieron diferentes concentraciones de sal, (Katori y col., 2003) hecho que no fue concordante al analizar los valores de caliceína urinaria para el grupo S, los cuales también disminuyeron para el tercer control y permanecieron así durante el tiempo en que se administró pellet hipersódico a esta serie. Este hecho también podría explicar el incremento en los valores de PA que se presentaron para el grupo S al momento de comenzar a recibir una dieta rica en sal, ya que como se ha dicho anteriormente se ha visto una relación inversa entre los valores de caliceína urinaria y las mediciones de PAS.

Al analizar los electrolitos urinarios podemos observar una disminución en la excreción de sodio durante el periodo de inducción para las series tratadas con L-NAME (NL y NS) disminución observada en otros estudios realizados con inhibidores de las síntesis de NO en diferentes concentraciones, este hecho se explicaría ya que al haber una disminución en la producción de NO se inhibe también su efecto natriurético produciéndose una retención

de este electrolito y agua, lo que se relaciona además con la disminución en los valores obtenidos de calicreína urinaria para estas dos series.(Lahera y col., 1991 (b); Manning y col, 1997)

Podemos observar un marcado aumento en la excreción de sodio y cloruro en estas series a partir de la cuarta semana y que se mantiene hasta finalizar el experimento, lo que es explicable por el aumento en el consumo de sal por parte de estas series.

Nuestros resultados demuestran la aparición de HTA sal sensible en este modelo de inhibición de NO asociados a daño TI y reducción en la excreción de calicreína urinaria, en aquellas series tratadas con L-NAME. La destrucción del espacio TI puede involucrar espacialmente al SCC reduciendo su actividad, lo que hemos evidenciado a través de la medición de calicreína urinaria, y esto expresarse como un ineficiente manejo en la excreción de sodio, lo que secundariamente produce una HTA. No podemos descartar una significativa reducción en la acción vasodilatadora directa del sistema, el que sin duda puede desbalancear los mecanismos controladores del tono vascular favoreciendo la aparición de HTA.

CONCLUSIONES

- La administración de L-NAME en una concentración de 116 mg/Kg por un periodo de tres semanas produce, durante este tiempo, una intensa proteinuria asociada a un aumento en los valores de presión arterial sistólica y disminución de los valores de actividad de calicreína urinaria y excreción de sodio urinario, esto debido a la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, con lo que se inhibe las capacidades propias del óxido nítrico como agente vasodilatador y antiinflamatorio.
- La inhibición de la síntesis de óxido nítrico produce inflamación local persistente lo que posteriormente lleva a daño renal (tubulointersticial), en vista de la ubicación del sistema Calicreína Cininas al haber daño tubulointersticial se está afectando a este sistema, hecho que se comprueba con la disminución de los valores de calicreína urinaria durante la fase de inducción del daño y durante el periodo de sobrecarga de sal en la dieta.
- El aumento en la cantidad de sal en la dieta de ratas tratadas previamente con L-NAME produce un aumento en los valores de presión arterial sistólica, esto relacionado con el daño tubulointersticial y la disminución en los valores de calicreína urinaria nos confirma la aparición de hipertensión sal sensible en este grupo.
- El aumento en la cantidad de sal en la dieta de ratas que no fueron tratadas con L-NAME (serie S), produce un aumento en los valores de presión arterial sistólica de la cepa en estudio, esto nos indica sal sensibilidad propia de esta cepa.
- Los resultados de nuestro trabajo valoran la importancia del daño de un sistema vasodilatador en la aparición de hipertensión arterial, y postulan la importancia de la actividad del sistema Calicreína Cininas en la aparición de hipertensión arterial sal sensible en este modelo de daño tubulointersticial renal. Lo anterior nos sugiere la importancia que pueden tener maniobras farmacológicas y no farmacológicas que

mantengan o estimulen la función del sistema Calicreína Cininas para la prevención de la hipertensión arterial asociada a daño renal.

ANEXOS

ANEXO 1

Método para la determinación de calicreína activa en orina

Preparación de las muestras.

Se descongelaron las muestras colocándolas a 4° C por 12 horas. Seguido a esto se centrifugaron a 12.000 r.p.m. por 30 min a 4° C para eliminar el sedimento que pudiese interferir en la lectura.

Se diluyeron las muestras 1:50 con buffer Tris – HCl pH 8.2. Cada muestra se trató en duplicado.

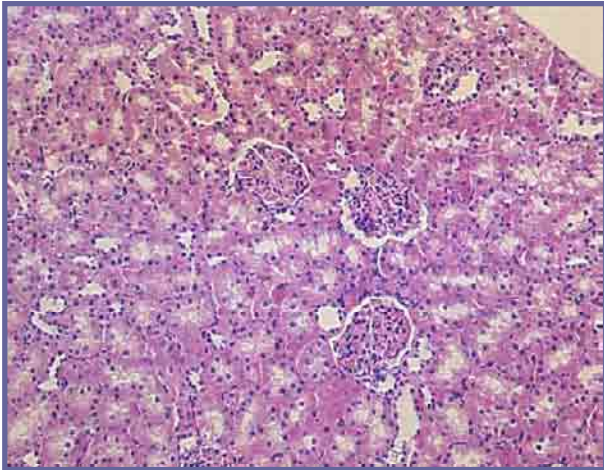
Técnica.

- Marcar tres cubetas: una cubeta B (blanco), una cubeta X₁ (muestra) y cubeta X₂ (muestra).
- Agregar a todas las cubetas 400 µl de buffer Tris – HCl pH 8.2 y 100 µl de orina diluida.
- Agregar 100 µl de Ácido acético 50% v/v a la cubeta B.
- Agregar 400 µl de STBI – EDTA (Inhibidor Tripsínico de Soya 1.5 mg/mL y EDTA 1.9mg/mL) (SIGMA ED2SS) (SIGMA T9003) a todas las cubetas.
- Agitar en Vortex.
- Incubar por 30 minutos a 37° C.
- Agregar 100 µl de sustrato sintético DL-Val-Leu-Arg-*p*-nitroanilide (V2628 Sigma Aldrich, St Louis MO, USA) a todas las cubetas.
- Agitar en Vortex.
- Incubar 30 minutos a 37° C.
- Agregar 100 µl de Ácido acético (AcOH) 50 % vol/vol a las cubetas X₁ y X₂.

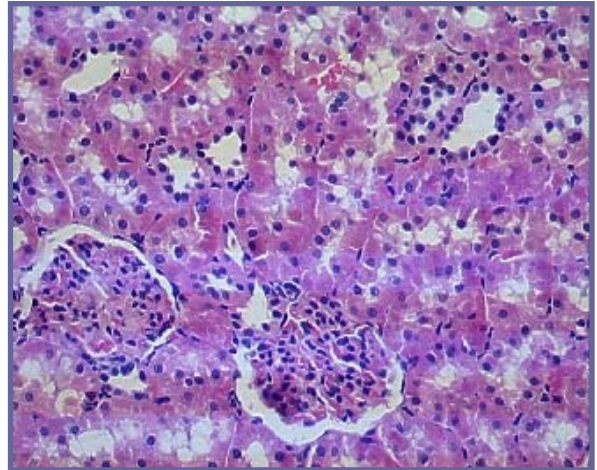
- Agitar en Vortex .
- Leer a 405 nm en espectrofotómetro Shimadzu llevando a cero con un blanco de buffer Tris – HCl pH 8.2.

ANEXO 2

Figura N° 1. Cortes histológicos de riñón de la serie W.

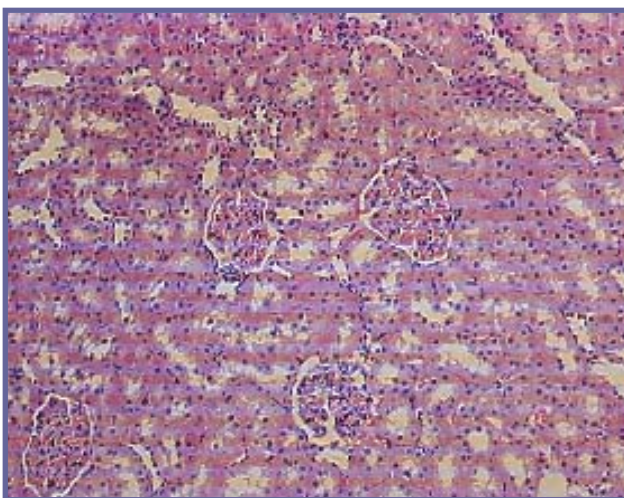


Aumento 10 X

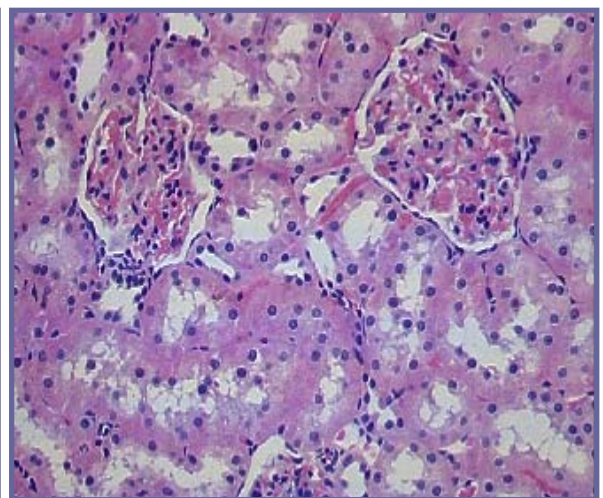


Aumento 20 X

Figura N° 2. Cortes histológicos de riñón de la serie S

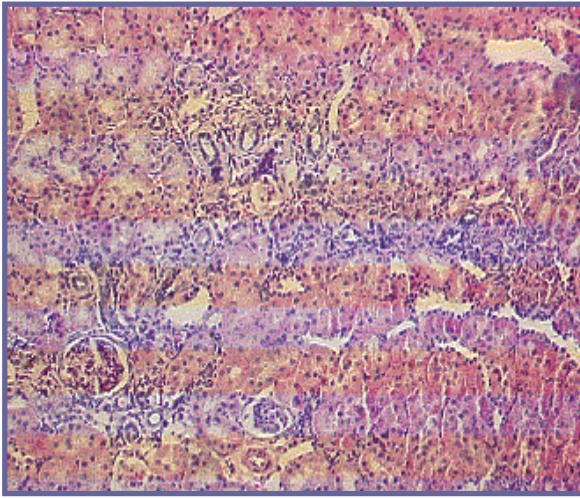


Aumento 10 X

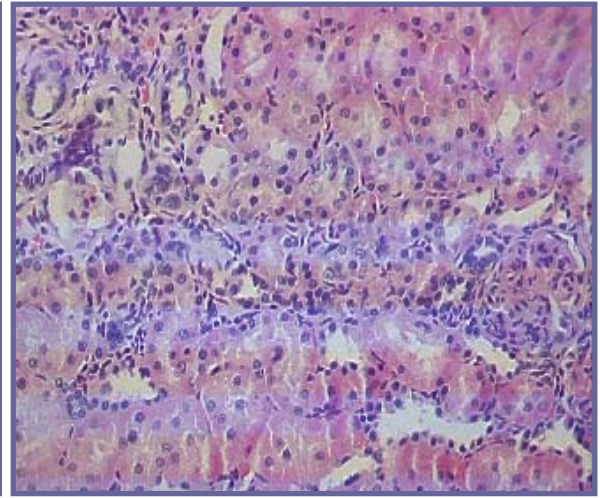


Aumento 20 X

Figura N° 3. Cortes histológicos de riñón de la serie NL

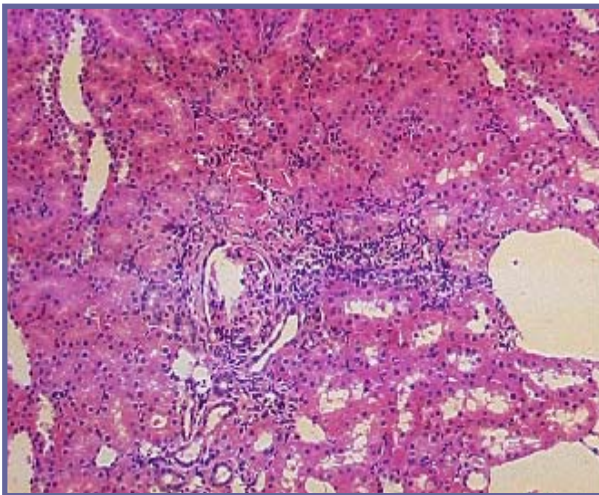


Aumento 10 X

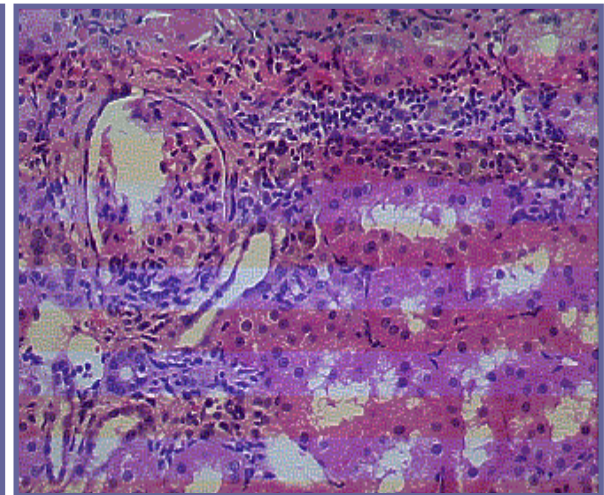


Aumento 20 X

Figura N° 4. Cortes histológicos de riñón de la serie NS



Aumento 10 X



Aumento 20 X

ANEXO 3

Figura N° 1 Formación del NO

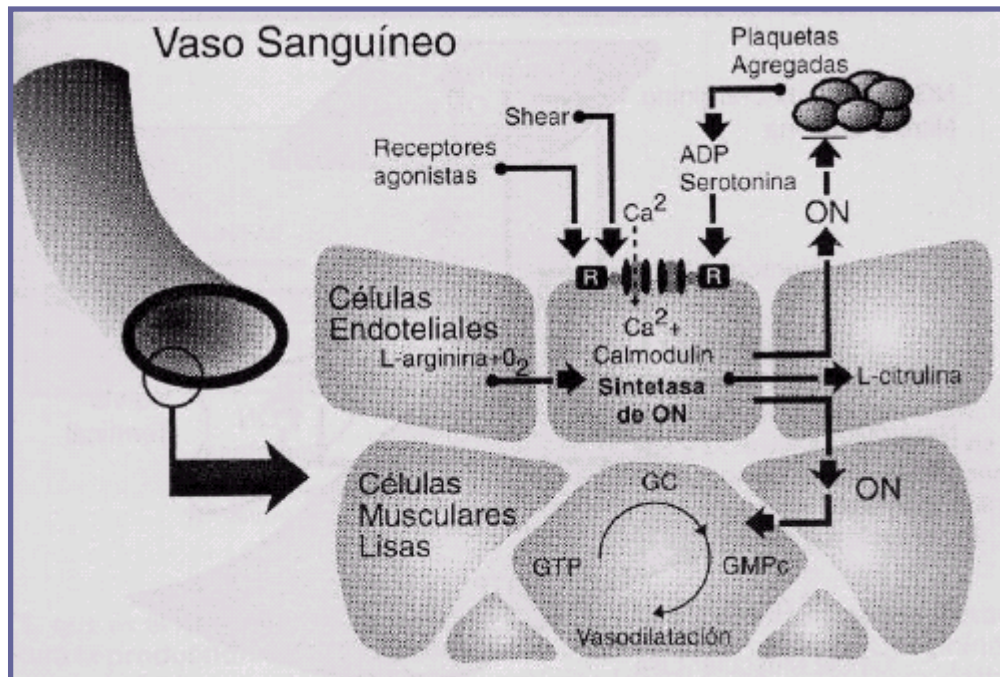


Figura N° 2 Cofactores en la formación del NO

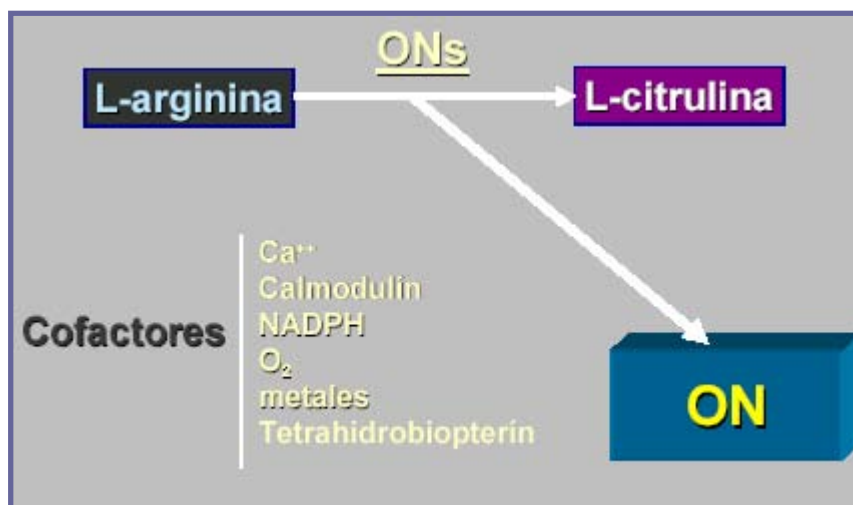
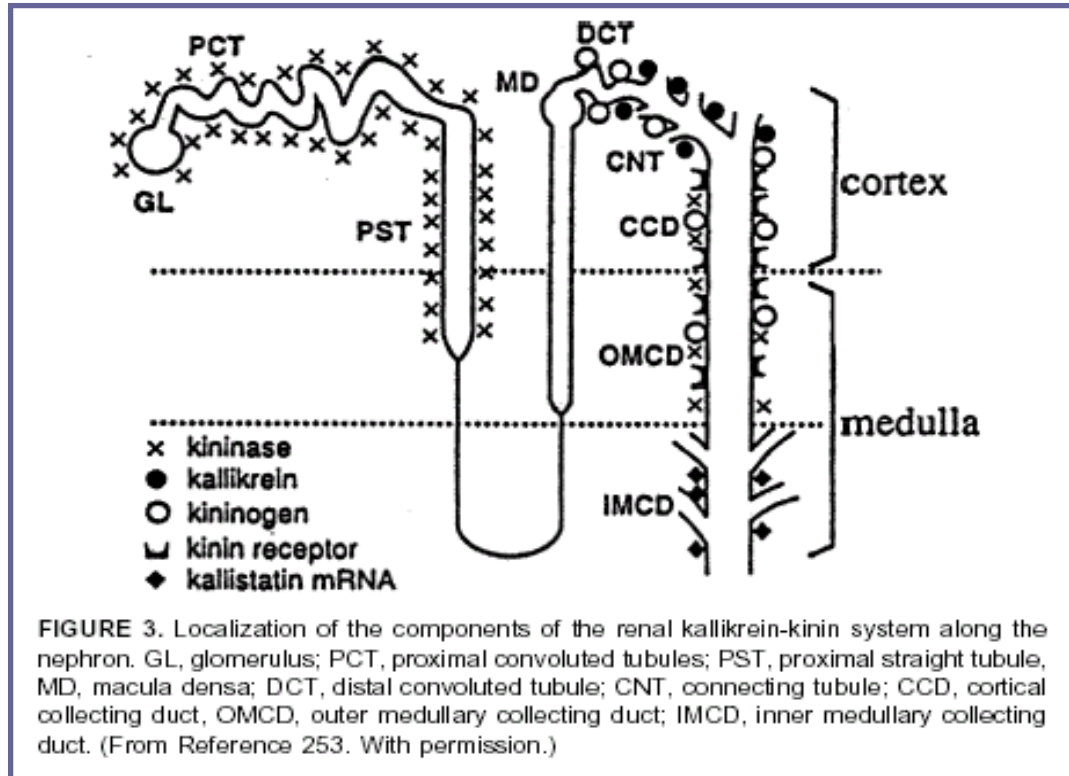
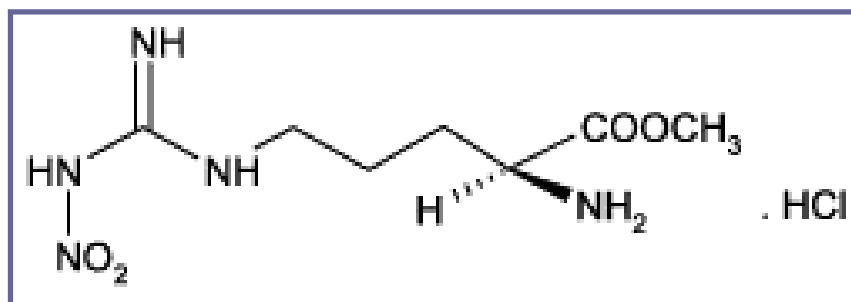


Figura N° 3 Localización de los componentes del sistema Caliceína Cininas renal a lo largo del nefrón.



Obtenido desde: The Renal Kallikrein-Kinin System: Its Role as a Safety Valve for Excess Sodium Intake, and Its Attenuation as a Possible Etiologic Factor in Salt- Sensitive Hypertension, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40(1):43-115 (2003)

Figura N° 4 Estructura química del L-NAME



ANEXO 4

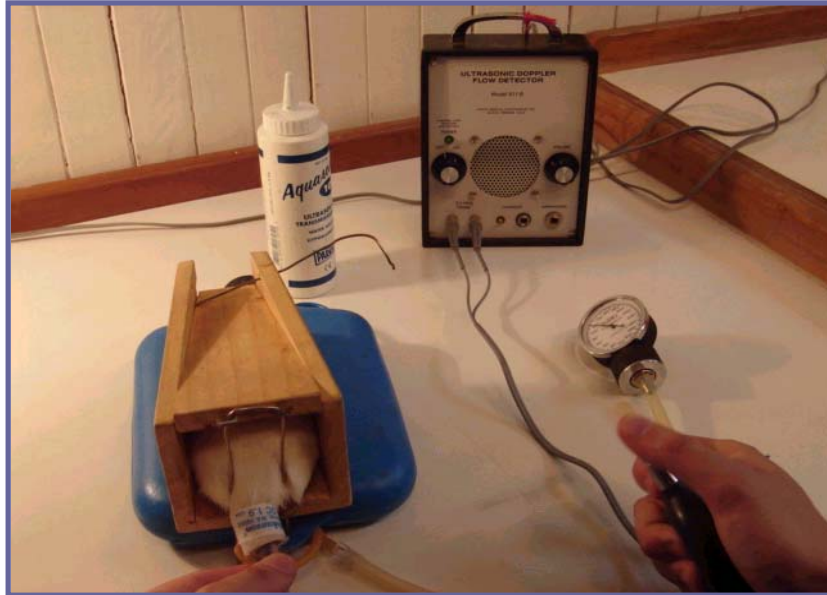
Fotografía N° 1. Bioterio de Histología y Patología, lugar donde se encontraban los animales durante todo el experimento.



Fotografía N° 2 Jaulas en donde se mantuvo a los animales separados según serie y en grupos de 4.



Fotografía N° 3 Equipo de ultrasonido Doppler y materiales necesarios para la medición de presión arterial sistólica tales como esfigmomanómetro, manguito inflable, gel para ultrasonido, cubículo de inmovilización y fuentes de calor.



Fotografía N° 4 Caja metabólica y accesorios necesarios para la obtención de muestras de orina.



Fotografía N° 5 Balanza Söehnle



BIBLIOGRAFÍA

- Alfieri, A., (2002) Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Disponible en: <http://Caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeDieciseis/Articulos/Farmacologia/ArchivosPDF/articulosfarmacologia.pdf>.
- Antri, B. (2004) Actividad del sistema Calicreína-Cinina en un modelo de hipertensión arterial sal dependiente. Seminario de titulación, Escuela de Tecnología Médica Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile
- Ardiles, L., Figueroa, C., Mezzano, S., (2003) Renal Kallikrein-Kinin System damage and Salt Sensitivity: Insights from experimental models. *Kydney International*, 64, Supplement 86, S2-S8.
- Bhoola, K., Figueroa, C., Worthy, K., (1992) Biorregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacological Reviews*, 44, 1-61
- Berne, R., (1998) Fisiología. 2ª. Ed. Harcourt Brace, Madrid. pag. 291-299,313-320.
- Cabrera W., (1997) Fisiología, genética, medio ambiente e historia natural de la hipertensión arterial. *Revista Peruana de Cardiología*, H23, 9-21.
- Capmbell, D., (2006) L-NAME hypertension: trying to fit the pieces together. *Journal of Hypertension*, 24, 33-36.
- Cárcamo, N., (2000) Efecto de los extractos etanólico y acuoso de *Allium ampeloprasum* (ajo chilote) sobre la presión arterial, administrados por vía oral en ratas hipertensas inducidas por L-NAME. Tesis, Escuela de Medicina Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- Chatain, I, (1986) Anatomía macroscópica funcional y clínica. Ed. Addison-Wesley Iberoamerica, Wilmington. pag. 526.

- Chao, J., Chao, L., (1997) New experimental evidence for a role of tissue kallikrein in hypertension. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 12, 1569-1574.
- Croxatto, H., (1981) Calicreína renal y presión sanguínea. *Revista Médica de Chile*, 109, 143-152.
- Dominiczak, A. F., Bohr, D. F. (1995) Nitric oxide and its Putative role in hypertension. *Hypertension*, 25, 1202-1211.
- Elghozi, J., (1988) Electrolytes, hormones and blood pressure. *Kidney*, 33, 557.
- Florez, J, (1997) Farmacología humana. 3ª. Ed. Masson, Barcelona. pag. 336-339, 674-675.
- Figueroa, C., MacIver, A., Mackenzie, I., Bhoola, K., (1988) Localization of immunoreactive kininogen and tissue in the human nephron. *Histochemistry*, 89, 437-442.
- Fuhijara, C., Noronha, I., De Nucci, G., Zatz, R. (2001) Mycophenolate mofetil reduces renal injury in the chronic nitric oxide synthase inhibition model. *Hypertension*, 37, 170-175.
- Ganong, W, (1998) Fisiología médica. 16ª. Ed. Manual Moderno, México. pag. 661-668.
- Guyton, A, (1998) Tratado de fisiología médica. 9ª. Ed. Interamericana, México. pag. 182, 216-223, 223-235.
- Guyton, A, (1998) Fisiología y Fisiopatología. 6ª. Ed. Mc-Graw-Hill Interamericana, México. pag. 115-168.
- Guyton, A, (2002) Manual de fisiología médica. 10ª. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana de España, Madrid. pag. 117-133.
- Katori, M., Majima, M., (2003) The Renal Kallikrein-Kinin System: Its Role as a Safety Valve for Excess Sodium Intake, an Its Attenuation as a Possible Etiologic

Factor in Salt Sensitive Hypertension. *Clinical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40, 43-115.

- Katzung, B, (2002) Farmacología: básica y clínica. 8ª. Ed. El Manual Moderno, México. pag. 342-347, 373-376.
- Kone, B., Baylis, C., (1997) Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *American Journal of Physiology*, 272, F561-F578.
- Lahera, V., Navarro-Cid, J., Cachofeiro, V., García-Estan, J., Ruilope, M., (1997) Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am. J. Hypertension*, 10, 129-140.
- Lahera, V., Salom, M., Miranda-Guardiola, M., Mondaca, S., Romero, C., (1991) Effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am. J. Physiology*, 261, F1033-F1037.
- Lombardi, D., Gordon, K., Polinsky, P., Suga, S., Schwartz, S., Johnson, R., (1999) Salt-Sensitive Hypertension Develops After Short-Term Exposure to Angiotensin II. *Hypertension*, 33, 1013-1019.
- Madeddu, P., Varoni, M., Demontis, M., Pinna-Parpaglia, P., Glorioso, N., Anania, V., (a) (1996) Urinary Kallikrein: A marker of blood pressure sensitivity to salt. *Kidney International*, 49, 1422-1427.
- Madeddu, P., Varoni, M., Demontis, M., Pinna-Parpaglia, P., Glorioso, N., Anania, V., (b) (1997) Kallikrein-Kinin System and blood pressure sensitivity to salt. *American Heart Association*, 29, 471-481.
- Manning, R., Hu, Jr, L., Reckelhoff, J., (1997) Role of nitric oxide in the arterial pressure and renal adaptations to long-term changes in sodium intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 272, 1162-1169.
- McPhee, S. (2000) Fisiopatología Médica: Una introducción a la medicina clínica. 2ª Ed. Editorial El Manual Moderno, México. pag. 295-317, 435-443.

- Mondaca, S., Palmer, R., Higgs, A., (1991) Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43, 109-135.
- Mountokalakis, T., (1997) The renal consequences of arterial hypertension. *Kidney International*, 51, 1639-1653.
- Ojeda, D. (2003) Efecto del mofetil micofenolato sobre el sistema calicreína-cininas en el modelo experimental de inhibición de la síntesis de óxido nítrico en ratas con L-NAME. Tesis, Escuela de Medicina Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- Rodrigo, J., Alonso, D., Fernández, A., Serrano, J., López, J., Encinas, J., Fernández Vizarra, P., Castro, S., Peinado, M., Pedrosa, J., Richard, A., Uttenthal, L., Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salu/anales/textos/vol23/n2/colab.html>
- Rees, D., Schulz, R., Hodson, H., Mondaca, S., (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacology*, 101, 746-752.
- Salas, S., Vuletin, J., Giacaman, A., Rosso, P., Vio, C., (1999) Long-term nitric oxide synthase inhibition in rat pregnancy reduces renal kallikrein. *Hypertension*, 34, 865-871.
- Swenson, S., Speth, R., Porter, J., (2004) Effect of a perinatal high-salt diet on blood pressure control mechanism in young Sprague Dawley rats. *Am. J. Physiol Regul Intergr com Physiol*, 286, R764-R770.
- Quiroz, Y., Pons, H., Gordon, K., Rincón, J., Chávez, M., Parra, G., Herrera-Acosta, J., Gómez-Garre, D., Largo, R., Egido, J., Johnson, R. J., Rodríguez-Iturbe, B. (2001) Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281, 38-47.

- Tresguerres, J., Aguilar, E., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Gil, P., Lahera, V., Martinez, J., Mora, F., Rodriguez, R., Romano, M., Tamargo, J., Zarco, P., (1999) *Fisiología Médica*. 2ª Ed., Editorial McGraw Hill. Interamericana. España.
- Vio, C., Loyola, S., Velarde, V., (1992) Localization of components of the Kallikrein-kinin system in the kidney: Relation to Renal function. State of the Art. Lecture. *Hypertension*, Suppl II, 19, 10-16.
- Weinberger, M., (1996) Salt Sensitivity of Blood Pressure in Humans. *Hypertension*, 27, 481-490.
- Zhang, X., Scicli, A., Nasjletti, A., Hintze, T., (1997) Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension*, 30, 1105-1111.
- Zatz, R., Baylis, C., (1998) Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32, 958-964.