



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Leopoldo Ardiles A.
INSTITUTO: Medicina, Unidad de Nefrología.
FACULTAD: Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dra. Sara Rodríguez C.
INSTITUTO: Histología y Patología
FACULTAD: Medicina

“PROTECCIÓN ANTIHIPERTENSIVA DEL SISTEMA CALICREÍNA CININAS RENAL EN UN MODELO ANIMAL DE SAL-SENSIBILIDAD”

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

JESILANE MACARENA ROJAS CORTEZ

VALDIVIA-CHILE

2006

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar a Dios.

A mis padres por darme todo lo necesario para llegar a lograr una de mis mayores metas en esta vida, su cariño, compañía y paciencia inagotable, a mis hermanos que siempre me apoyaron y confiaron en mí. Los quiero con todo mi corazón.

A todo el personal de la unidad de Nefrología, por su ayuda profesional y motivación que fueron muy importantes para llevar a buen término esta tesis, en especial y primer lugar al Dr. Leopoldo Ardiles, por su gran profesionalismo y compromiso con sus alumnos, a la T.M Sra. Graciela Valderrama, T.M Sra. Maria Eugenia Burgos por su constante colaboración.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Sara Rodríguez, por su gran espíritu y dedicación, como profesional, docente y persona.

Un agradecimiento especial al T.M y futuro médico, Fernando Loyola, por su amistad, paciencia y disposición.

Gracias.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODO.....	13
RESULTADOS	
Peso corporal.....	19
Presión arterial sistólica.....	21
Actividad de Calicreína urinaria.....	23
Excreción de electrolitos.....	25
Proteinuria.....	29
Correlación de Spearman.....	31
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	37
Proyección del trabajo	
LITERATURA CITADA.....	38
ANEXOS.....	42

1. RESUMEN

El desarrollo de daño túbulo intersticial (DTI) adquirido en las primeras etapas de la hipertensión esencial genera las condiciones para una sal dependencia, característica de este trastorno. El modelo de sobrecarga proteica, produce en su fase de inducción un importante DTI, hipertensión arterial y daño del Sistema Calicreína-Cininas Renal (SCC), los animales con posterioridad a la suspensión de la noxa, desarrollan hipertensión sal-sensible. Varios estudios en este modelo han mostrado activación del sistema Renina-Angiotensina, sin embargo, su contraparte vasodilatadora y natriurética, el SCC, no ha recibido mayor atención.

Hipótesis: la estimulación del SCC mediante dieta rica en potasio puede proteger de la sal sensibilidad.

Material y métodos: Ratas hembras (Sprague-Dawley) fueron inyectadas con 2 g/día de seroalbúmina de bovino intraperitoneal por 14 días, observadas durante un período de recuperación de dos semanas, y luego recibieron dieta hipersódica al 4%. Para evaluar el efecto estimulador del potasio sobre el SCC, un segundo grupo inyectado en la misma forma, recibió KCl al 2% en agua durante todo el experimento (8 semanas). La actividad de calicreína urinaria (CalU), fue medida por método amidásico.

Resultado: El grupo tratado con potasio mostró un aumento significativo en la excreción de CalU con respecto al grupo control al final del experimento ($18 \pm 6,9$ v/s $6,5 \pm 3,7$ mU calicreína /mg creatininuria), acompañada de una disminución significativa de la presión arterial sistólica ($129 \pm 15,4$ v/s $163 \pm 7,7$ mmHg).

Conclusión: la estimulación del SCC a través de una dieta rica en potasio es capaz de proteger de la hipertensión sal sensible en este modelo experimental.

1. SUMMARY

Evidences of acquired tubulointerstitial damage (TID) exist in the first stages of essential hypertension generating conditions to develop salt dependence, characteristic of this disease. The overload proteinuria rat models is characterized by important TID, hypertension and down-regulation of the Renal Kallikrein-Kinin System (KKS) during the induction phase and subsequently develop salt-sensitive hypertension. Many studies in the model have shown activation of the RAS, but not enough attention has been paid to their vasodilator and natriuretic counterpart the KKS.

Hypothesis: the stimulation of the KKS by a high potassium diet may protect of the salt sensitivity.

Methods: Female rats (Sprague-Dawley) were injected with 2g/d, intraperitoneal, of bovine seroalbumin (BSA) 14 doses; after a recovery phase of 2 weeks, they received hipersodic diet (4%). To evaluate the stimulatory effect of potassium on the KKS, a second group, injected in the same squedule, received KCl 2% in tap water all along the experiment (8 weeks). Urinary kallikrein activity was measured by enzymatic method at different points of the experiment.

Results: Potassium stimulated rats showed a significant increase in Ku compared to the control group at the end of the experiment ($18 \pm 6,9$ vs $6,5 \pm 3,7$ mU kallikrein/mg creatininuria), accompanied by a significant decrease ($<0,05$) in the systolic BP ($129 \pm 15,4$ vs $163 \pm 7,7$ mmHg).

Conclusion: Stimulation of KKS may protect from salt-sensitivity in this animal model.

2. INTRODUCCIÓN

El control de la presión arterial (PA) involucra una compleja interacción entre diversos mecanismos y sistemas. Los factores que la modulan incluyen: el débito cardíaco, el volumen sanguíneo, los riñones, el sistema nervioso y numerosos factores humorales y eventos celulares en la membrana y dentro de las células vasculares. Estos múltiples factores mantienen una adecuada perfusión y nutrición a los tejidos y también pueden afectar la PA (Houssey, 2001).

El control de la PA a largo plazo corresponde al mecanismo renal y de los líquidos corporales (Izzo y Black, 1999). Existen a nivel renal, específicamente en el espacio túbulointersticial (TI), mecanismos vasoconstrictores y sal-retenedores, entre los que destaca el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA) por medio de la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con su producto final, la angiotensina-II (A-II) (Bhoola y col, 1992). Esta actúa sobre la musculatura lisa vascular contrayéndola, estimula la secreción de Aldosterona, potencia la actividad del sistema nervioso simpático, lleva a la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, estimula las prostaglandinas, libera endotelinas y óxido nítrico y estimula el mecanismo de la sed (Ganong, 1998).

Los sistemas vasoconstrictores tienen su contrabalance vasodilatador representados por la prostaglandina E, prostaciclina, péptido natriurético auricular, óxido nítrico y el Sistema Calicreína-Cininas Renal (SCC) (Izzo y Black, 1999) que es el principal responsable de la mantención del balance de sodio y agua, preservando el volumen y un adecuado tono vascular. (Bhoola y col, 1992).

Está claro que la hipertensión (HT) arterial es un desorden de los distintos factores que participan en su regulación y probablemente no tiene una causa única (Johnson y col, 2002).

En condiciones normales, al aumentar la concentración de sodio, ya sea por un exceso en la ingesta o en la liberación de aldosterona, se gatilla el SCC, comienza a inducir diuresis y natriuresis mediante la acción de las cininas, que inhiben la reabsorción tubular de sodio, comportándose como una válvula de seguridad frente a la acumulación de sodio (Katori, 1996; 1998). Por tanto, una generación defectuosa de cininas podría contribuir aumentando el tono vasoconstrictor, favoreciendo la retención de sodio y como consecuencia de ello la HT sal-sensible.

Últimamente ha quedado demostrado que el daño renal es el responsable de la HT sal-sensible. La sal-sensibilidad es un término usado para describir las modificaciones sobre la PA por variaciones en la ingesta de sodio (Campese, 1994; Weinberger, 1996), puede ser predictor de daño a órganos (principalmente renal y cardiovascular), y es un rasgo distintivo de la HT arterial esencial, particularmente en individuos mayores (Campese, 1994).

La influencia del balance de sodio en la respuesta presora a sustancias vasoactivas, da una explicación para la elevación de la presión sanguínea durante la dieta alta en sal en personas con catecolaminas aumentadas o niveles de renina altos. Se han realizado varios estudios en seres humanos relacionados a HT arterial y sal-sensibilidad (Florin y col, 2001; Morimoto y col, 1997), a pesar del interés y gran importancia clínica, aún no se conocen con certeza, los factores determinantes de la sensibilidad a la sal en humanos.

Se ha propuesto que el desarrollo de la HT sal-sensible ocurre en tres pasos donde el más importante es el rol que juega el daño del espacio túbulo intersticial (Jonson y col, 2002). Aquí es donde se ubican los sistemas reguladores y contrareguladores de la PA (Houssey, 2001), existiendo *up-regulation* de la ECA en el sitio del daño intersticial, por expresión de A-II e infiltración de linfocitos T, macrófagos (Quiroz y col, 2001, Rodríguez y col, 2001), y se postula un *down-regulation* de los sistemas vasodilatadores.

El SCC se ubica en las células del túbulo de conexión (entre el colector y el distal) (Figueroa y col, 1984; Xiong y Chao, 1989). Este sistema participa en el control de la mayoría de las funciones renales, principalmente en la regulación de la PA por medio de la modulación del flujo sanguíneo renal y regulación de la excreción de sodio y potasio (Elghozi, 1988). Sus principales componentes son una enzima (la calicreína), un sustrato (cininógenos de alto y bajo PM), enzimas catabolizadoras, o cininasas (Cininasa II o ECA), sustancias efectoras o Cininas (como lisil bradicinina y bradicinina), y activadores e inhibidores de calicreínas y cininas (Vio y col, 1992). La calicreína al activarse actúa sobre el cininógeno para formar bradicinina, un potente vasodilatador arteriolar que aumenta la permeabilidad capilar (Guyton, 2002) y no solo actúa como regulador de la PA sino también como un factor de crecimiento y desarrollo de la función renal (El-Dahr y col, 1998).

La vida media de las cininas en la circulación es muy breve (15 a 30 segundos) y su concentración en el plasma es muy pequeña (10^{-11} mol/l), por esto, aunque se sabe que el efecto sobre la musculatura lisa del riñón está dado por las cininas, el estudio del

SCC se enfoca a la determinación de calicreína, realizándose mediciones de calicreína urinaria (CalU) como marcador de la funcionalidad del sistema (Houssey, 2001).

Con respecto a la regulación de la PA se puede decir que 1) las cininas son potentes sustancias relajantes del músculo liso vascular y 2) sus efectos diuréticos y natriuréticos son consecuencia del aumento del flujo sanguíneo renal, aparentemente por reducción de la resistencia vascular en la zona papilar. De esta manera, las cininas no modifican la filtración glomerular ni la reabsorción proximal, pero logran aumentar la oferta distal de líquido (Houssey, 2001).

Hay evidencias de que el SCC participa en la patogénesis de la HT arterial esencial en humanos, situación caracterizada por presentar bajos niveles de Renina, Aldosterona y una disminución de CalU (Balsano, 1991). Existen opiniones respecto a la reducción de actividad del SCC renal podría ser un marcador de la agresividad de la HT esencial (Campese, 1994).

Si las cininas actúan como sustancias vasodilatadoras y favorecen la excreción de sodio, pueden proteger frente a la sal-sensibilidad; debido a que se ha observado en humanos hipertensos sal-sensibles una menor excreción de CalU comparado con sujetos resistentes a la sal (Ferri y col, 1993), y al administrar calicreína como fármaco oral a hipertensos, estos evidencian disminución de la PA, a diferencia de sujetos resistentes a la sal (Bellini y col, 1993; Sharma y col, 1996).

El modelo de sobrecarga de proteínas, ha sido muy usado para estudiar el rol de la proteinuria en la enfermedad renal progresiva (Eddy, 1995; Thomas, 1999) y se caracteriza por importante inflamación túbulo intersticial con tendencia a la fibrosis, leve

glomeruloesclerosis y clara up-regulation del SRA (Largo y col, 1999), sin embargo la presencia de HT no ha recibido especial atención.

En esta tesis se provoca un gran daño renal con sobrecarga de proteínas sistémica, inyectando intraperitonealmente a las ratas seroalbúmina de bovino (BSA) purificada libre de endotóxicas. Al administrarse altas dosis de proteínas (BSA) aumenta su absorción por parte de las células epiteliales glomerulares, provocándoles cambios como: vacuolización, hipertrofia, incremento en la reabsorción de moléculas y dilatación de la membrana basal glomerular que terminan por degenerar el epitelio glomerular, aumentando el tamaño de los poros de la membrana, permitiendo que moléculas como la albúmina atraviesen al espacio urinario (Weening, 1987; Abbate, 1999). El tráfico proteico a través de los túbulos (o reabsorción de proteínas) provoca una activación de los sistemas que allí se encuentran e inflamación TI.

Considerando la localización del SCC, es razonable pensar que como componente del daño TI exista una alteración de este sistema y por lo tanto, una alteración en su función reguladora de la PA, dejando sin contrapeso la acción de los sistemas vasoconstrictores y sal retenedores activados.

Estudios realizados por Rodríguez-Iturbe y col (2002), en ratas tratadas con sobrecarga de proteínas durante 2 semanas, mostraron que la magnitud y duración de la proteinuria fue suficiente para obtener un importante daño e infiltración túbulo intersticial, resultando en un desarrollo de HT sal sensible después de una dieta alta en sal. Estos efectos son similares a los reportados en HT sal-sensible provocada por infusiones de A-II (Rodríguez-Iturbe y col, 2001), inhibición de la síntesis de óxido nítrico (Quiroz y col, 2001) y ratas espontáneamente HT. Por otra parte, indican que la

administración de una droga inmunosupresora, mofetil micofenolato, durante el período de la sobrecarga proteica reduce marcadamente la infiltración inmune y previene el desarrollo de HT sal-sensible.

En 1955 se postuló que existe una estrecha relación entre CalU y excreción de potasio (Zinner y col, 1976). Un estudio realizado a microscopía electrónica reveló que una dieta rica en potasio produce hipertrofia e hiperplasia en las células del túbulo de conexión que producen calicreína, sugiriendo que este tipo de dieta aumenta la síntesis y secreción de calicreína (Vio y Figueroa, 1987). Efecto que se ha encontrado tanto en ratas (Obica, 1987; Suzuki, 2000), como en humanos (Perschow y Bulmer, 1998).

Se han propuesto diferentes agentes como estimuladores de la producción de CalU, aunque el estímulo secretor en estados fisiológicos y patológicos continúa siendo incierto (Makoto, 2003).

Se ha experimentado con infusiones intravenosas de potasio en ratas anestesiadas, observándose en la corteza de los riñones aislados un estímulo significativo en la liberación de calicreína. Por otra parte, en un estudio *in-vitro* se observó inducción de biosíntesis de calicreína secundaria a la liberación de Aldosterona desde la corteza adrenal después de una alta carga de potasio (Hayashi y col, 1999). Experimentos realizados con bloqueadores de los canales de potasio-ATP sensibles como la Glibenclamida, inhiben el flujo de potasio intracelular al bloquear el canal, mostrando un aumento significativo en la liberación de calicreína en cortes de corteza renal (Hayashi y col, 1999).

En esta tesis se estudia principalmente el efecto de una dieta rica en potasio como estimulante de calicreína renal para evaluar su potencial efecto hipotensor en el modelo de HT arterial sal-sensible por sobrecarga de proteínas.

Con todos estos antecedentes recién expuestos nos han conducido a formular la siguiente hipótesis.

2.1 FORMULACION DE LA HIPOTESIS

La estimulación del sistema calicreína cinina mediante la administración de soluciones de potasio protege de la sal-sensibilidad inducida por el daño túbulo intersticial secundario a la sobrecarga de albúmina en ratas Sprague Dawley.

2.2 OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de la estimulación del Sistema calicreína-cininas (SCC) sobre la sal-sensibilidad observada después del daño túbulo intersticial por sobrecarga de albúmina exógena

2.2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Probar el efecto de la administración continua de una dieta rica en potasio sobre la actividad urinaria de calicreína.
- Evaluar el efecto de la estimulación de calicreína renal sobre la aparición de sal sensibilidad posterior a la sobrecarga de albúmina.
- Evaluar el efecto hipotensor de la estimulación del SCC renal mediante una dieta rica en potasio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales:

3.1.1 Material biológico: los animales de experimentación utilizados en este modelo fueron 14 ratas hembras de cepa Sprague Dawley, de 8 semanas y peso $180 \pm 12,6$ g, normotensas y sin proteinuria, provenientes y seleccionadas desde el Bioterio del Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile. Los animales se mantuvieron en salas con temperatura constante de 22°C y ciclos de luz oscuridad de 12 horas, alimentación y agua de bebida *ad libitum*.

3.1.2 Material farmacológico: Seroalbúmina de bovino (BSA) (fracción V, A 4503 SIGMA), éter dietílico p.a (M=74,12 gr/mol, pureza $\geq 99,7\%$, Merck®), solución salina isotónica NaCl 0,9%, cloruro de potasio, KCl (Merck®), cloruro de sodio, NaCl (sal Lobos®)

3.1.3 Material para medir la presión arterial: Equipo ultrasonido Doppler modelo 811-B (PARKS Electronics Inc. Oregon USA), esfigmomanómetro y manguito inflable de goma, gel para ultrasonido, cubículo de inmovilización, fuente de calor.

3.1.4 Material para recolección de orina: Jaulas metabólicas, frascos recolectores de orina, papel filtro, embudos, tubos de polipropileno, guantes de látex.

3.1.5 Material de laboratorio: Matraces, probetas, balanza, jeringas, estufa de secado, guantes de látex.

3.1.6 Material para determinación de proteínas: Tiras reactivas Combina 3 Test® para medición semicuantitativa y Autoanalizador (U/CSF Protein, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), para proteinuria cuantitativa.

3.1.7 Material para la determinación de creatinina urinaria y sérica: Kit comercial Wiener[®] para determinación cuantitativa de creatinina en orina y suero, Espectrofotómetro Shimadzu[®], centrifuga clínica.

3.1.8 Material para la determinación de calicreína urinaria: Buffer Tris-HCl pH 8.2, Sustrato sintético DL-Val-Leu-Arg-p-nitroanilide (V2628 SIGMA Aldrich, St. Louis MO USA), SBTI-EDTA (Inhibidor Tripsínico De Soya 1,5mg/mL y EDTA 1,9 mg/mL) (SIGMA ED2SS T9003), Ácido acético 50% v/v, Espectrofotómetro Shimadzu[®].

3.1.9 Material para determinación de electrolitos: Analizador ion selectivo semiautomático EasyLyte Plus Na⁺/K⁺/Cl⁻.

3.2 Método:

3.2.1 Condiciones experimentales:

Se conformaron dos grupos experimentales. La alimentación para ambos grupos fue pellet (Champion S.A., Sgto., Chile), (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), e hidratación *ad libitum*.

1. Grupo BH (n= 6): ratas que recibieron una sobrecarga de proteica para continuar con un periodo de washout (w/o) y finalmente recibir una dieta hipersódica.

2. Grupo BHK (n= 8): ratas que recibieron un tratamiento desde 4 semanas previas a la inducción proteica y durante el w/o con soluciones de KCl al 2% en el agua de bebida. La concentración de la solución de potasio fue reducida al 1% durante la fase de sobrecarga de sal para evitar un exagerado exceso de cloro.

El diseño experimental incluyó 3 fases durante un período de 8 semanas.

INDUCCIÓN: Esta primera fase alcanzó a 14 días, período en que se efectuó la sobrecarga proteica exógena intraperitoneal (ip) (inducción del daño TI). Las ratas de ambos grupos fueron anestesiadas con éter previo a inyecciones diarias (ip) de 2 gramos de BSA. En este período ambos grupos recibieron dieta normosódica.

WASHOUT (w/o): En esta segunda fase las ratas dejaron de recibir las inyecciones de BSA para iniciar un periodo de 2 semanas denominado w/o, durante el cual, ambos grupos recibieron dieta normosódica.

SAL-SENSIBILIDAD: Corresponde a la última fase, en que por 4 semanas las ratas recibieron pellet hipersódico (4% NaCl).

A las ratas se controló: peso corporal, presión arterial sistólica, y se obtuvieron muestras de orina. Dichos controles se realizaron: Pre-inducción de daño renal; primera y segunda semanas de inducción; final del washout; y a la segunda, tercera y cuarta semanas de tratamiento con dieta alta en sal. Al **grupo BHK**, se le realizó controles de peso corporal, PA sistólica y de orina previo a la administración del potasio y durante las mismas etapas posteriores que el grupo BH.

Al completar las 4 semanas de dieta hipersódica las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia etérea por exanguinización para luego proceder en forma inmediata a la extracción de ambos riñones, que serán usados en otros estudios.

3.2.2 Determinación de peso corporal de ratas: se realizó con una balanza Schoenle (Anexo 1).

3.2.3 Medición de la presión arterial sistólica (PAS): se midió a ratas conscientes, previa inducción de vasodilatación a la arteria caudal por calor, usando el detector de ultrasonido Doppler y un manguito de goma. Se obtuvieron 6 medidas de presión y se calculó el promedio de ellas. (Anexo 2)

3.2.4 Recolección de muestras de orina: cada rata se alojó en una jaula especialmente acondicionada para la recolección de la orina durante 24 horas. Se les administró la hidratación correspondiente y no se les aportó alimento para evitar al máximo la contaminación fecal (Anexo 3 y 4).

3.2.5 Análisis de las muestras de orina:

Se midió diuresis (en probeta), proteinuria semicuantitativa (con tiras reactivas comerciales), proteinuria cuantitativa por método turbidimétrico (Iwata and Nishikase modificado en autoanalizador Urinary/CSF Protein Roche Diagnostic), creatinina urinaria (método colorimétrico de Jaffé en espectrofotómetro Shimadzu a 510 nm), calicreína urinaria (mediante el método amidásico de punto final) y electrolitos Na^+ , K^+ , Cl^- en equipo semiautomático (Easy Lyte Plus).

3.2.6 Determinación de Calicreína Urinaria Activa:

La actividad de calicreína urinaria fue determinada por el método amidásico de punto final (ver anexo 5). Para esto se usó el sustrato sintético DL-Val-Leu-arginina-*p*-nitroanilide en presencia de los inhibidores SBTI (Inhibidor Tripsínico de Soya) y EDTA (Etilendiaminotetraacetato) que bloquean proteasas inespecíficas presentes en orina y que presentan actividad similar a Calicreína (Bönner, 1981; Berthoud, 1987). En esta reacción se libera *p*-nitroanilina, cromógeno que se detecta después de incubar la enzima con su sustrato por 30 minutos a 37°C, deteniendo la reacción con Ácido acético (AcOH) al 50% v/v (Meani y col, 1985). El incremento de la densidad óptica es proporcional a la tasa de formación de *p*-nitroanilina (Meani y col, 1985), que se mide a 405 nm en espectrofotómetro. La reacción fue realizada en duplicado y leída contra un blanco de muestra. Los valores se expresaron en mU calicreína/mg creatininuria para evitar las diferencias de volúmenes urinarios recolectados.

3.2.7 Preparación de solución de Albúmina: la solución inyectable de BSA se preparó disolviendo 120 g de la proteína liofilizada en 200ml de NaCl 0,9%, luego se centrifugó a 4°C y 12.000 r.p.m. por 30 minutos para ser filtrada por filtro Millipore 0,4 µm en cámara de flujo laminar (vertical), evitando así una posible contaminación bacteriana. Se midió concentración de lo preparado por espectrofotometría, obteniéndose concentraciones alrededor de 38% y se mantuvieron a -20°C en congelador hasta su posterior uso. Previo a ser inyectadas fueron descongeladas hasta alcanzar la temperatura corporal de la rata (Eddy, 1989).

3.2.8 Preparación de pellet salado: para preparar 1 kilo de pellet al 4% de NaCl, se pesaron 41,6 g de NaCl y se disolvieron en 500ml de agua potable, esta solución se esparce homogéneamente sobre el pellet y se deja en estufa de secado a 39,5°C durante 12 horas.

3.2.9 Análisis estadístico: Se utilizó el programa estadístico comercial InStat (GraphPad InStat®, versión 3.01 para Windows) y Microsoft Excel para confección de los gráficos. Los valores fueron expresados como promedio $\pm$ la desviación estándar. El análisis de las diferencias entre los grupos se realizó con el test no paramétrico de Mann-Whitney y para el análisis intragrupal se uso el test de Wilcoxon-matched-pairs-signed-ranks. También se realizó una correlación mediante el test de Spearman para evaluar las asociaciones entre variables. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos y $p < 0,005$ muy significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal

La evaluación de los datos obtenidos en las diferentes etapas mostró una ganancia gradual de peso en ambos grupos (Fig. 1).

Al analizar los datos del periodo previo a la inducción (PI), se obtuvo una muy significativa diferencia de peso (BH vs BHK, $182 \pm 9,1$ vs $231 \pm 15,0$ $p < 0,005$), la que se mantuvo hasta la 1ª semana de sobrecarga proteica, y se pierde al llegar a la 2ª semana de BSA donde no se detectó diferencia significativa de peso entre ambos grupos.

Durante todo el período experimental con dieta rica en sal, final del experimento, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, obteniéndose pesos finales, para BH $241 \pm 12,1$ g y BHK $260 \pm 21,7$ g.

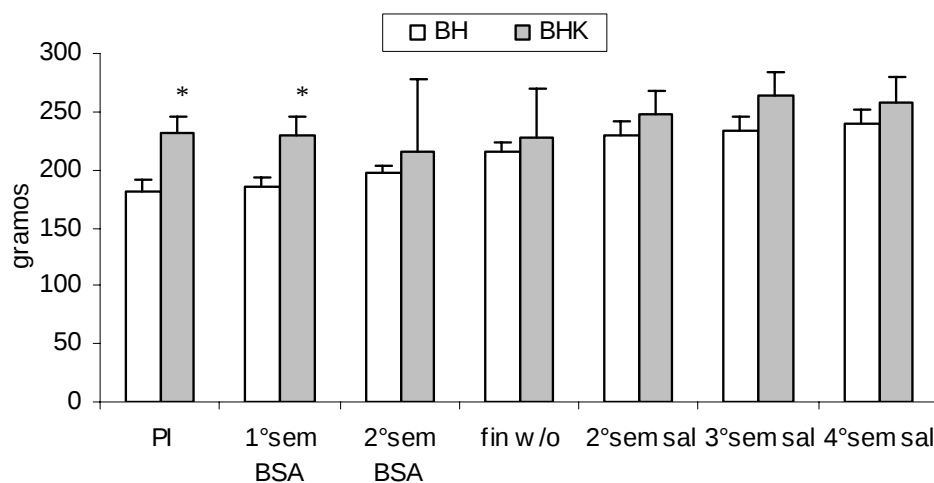


Figura 1. Control de peso durante el experimento. (* $p < 0,05$)

El grupo BHK mostró un aumento significativo de peso durante las semanas de administración de KCl (PK) hasta llegar al control PI (PK $182 \pm 16,0$ vs PI $231 \pm 15,0$ g, $p < 0,05$) (figura 2).

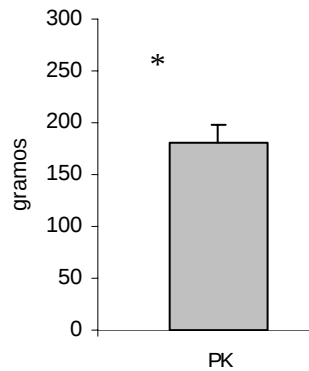


Figura 2. Peso corporal de ratas BHK, pre administración de soluciones de potasio (PK) vs pre-inducción (PI) de daño renal, $*p < 0,05$.

4.2 Presión arterial sistólica (PAS)

En la figura 3 se muestran las determinaciones de PAS durante las 8 semanas del experimento, en donde se observa claramente que el grupo BHK mantuvo sus valores de PAS mas bajos que los del grupo BH.

Ambos grupos de ratas iniciaron el experimento con PAS muy similares y sin diferencias significativas. Durante el período de inducción del daño renal, las ratas del grupo BH mostraron un aumento significativo de PAS comparado con el control PI. Si bien para el grupo BHK el aumento fue significativamente menor a la 1° semana de BSA que el detectado en el grupo BH (Tabla 1) a la 2° semana de tratamiento no se manifestaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ambos grupos, (BH vs BHK, $147 \pm 5,9$; $139 \pm 11,3$ mmHg; $p > 0,05$). En los controles realizados después de las 2 semanas de w/o, las ratas BHK mostraron una importante disminución de la PAS, en tanto que el grupo BH mantuvo valores elevados de PAS, como se ve en la tabla 1.

Al comparar los valores de PAS entre los grupos durante el período de sal-sensibilidad, se apreciaron diferencias muy significativas. Las presiones del grupo BHK fueron significativamente menores a las del grupo BH, siendo especialmente notorias a la 4° semana de sal, llegando incluso a no encontrarse diferencia significativa con los valores de la etapa PI.

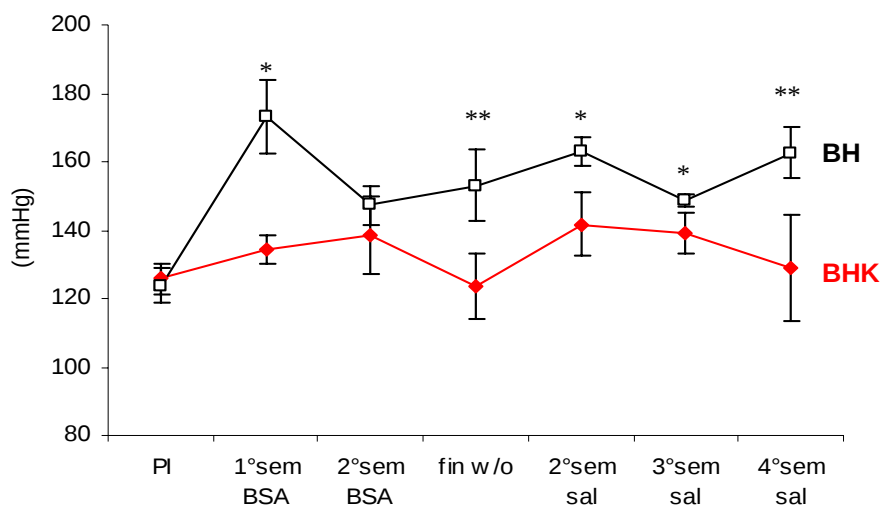


Figura 3. Presiones arteriales sistólicas, BH y BHK, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Tabla 1. Datos de PAS (mmHg), durante los controles:

Controles	BH	BHK
Pre-inducción (PI)	124 ± 5,1	126 ± 4,2
1° semana BSA	173 ± 10,7	134 ± 4,0*
2° semana BSA	147 ± 5,9	139 ± 11,3
Fin w/o	153 ± 10,4	123 ± 9,4**
2° semana 4% sal	163 ± 4,1	142 ± 9,3*
3° semana 4% sal	149 ± 2,1	139 ± 5,9*
4° semana 4% sal	163 ± 7,7	129 ± 15,4**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

El grupo BHK no mostró una diferencia estadísticamente significativa al analizar los valores PAS pre-potasio (PK), con los valores PI (PK $126 \pm 9,9$ vs PI $127 \pm 4,5$ mmHg), (figura 4).

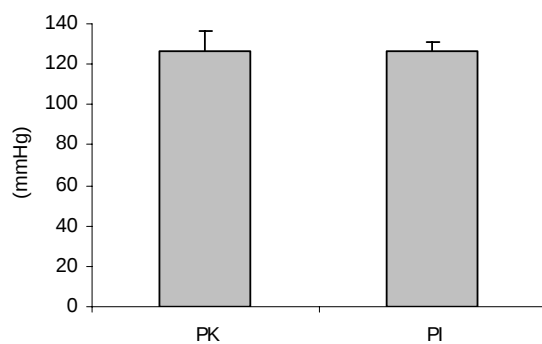


Figura 4. PAS de ratas BHK PK vs PI.

4.3 Actividad de calicreína urinaria (CalU)

Los valores de CalU de ambos grupos, durante la fase de inducción de daño TI, manifestaron una evidente disminución, tanto a la 7^a dosis como a la 14^o (figura 5). Luego del periodo de w/o, los valores de CalU se recuperaron significativamente en el grupo BHK, en cambio el grupo BH mantuvo sus valores notoriamente bajos (tabla 2). Durante las semanas de dieta hipersódica (sal-sensibilidad), las ratas del grupo BH continuaron mostrando valores significativamente menores comparados con los niveles pre-inducción. Por su parte, el grupo BHK evidenció un alza, llegando a mostrar cifras significativamente mayores que las BH a la 4^a semana.

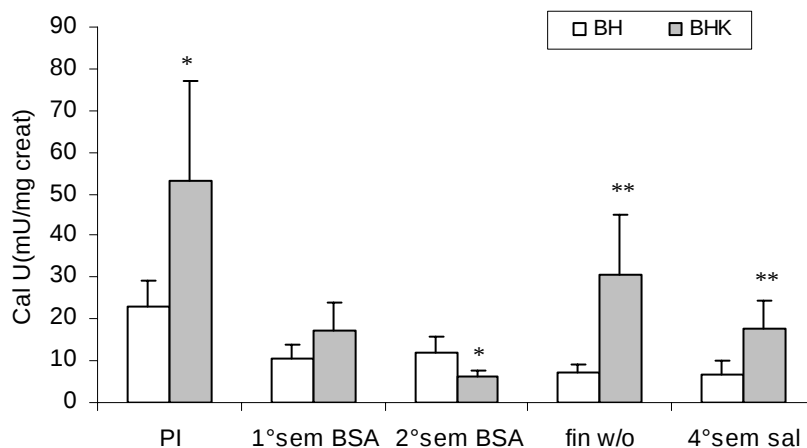


Figura 5. Excreción de CalU durante todo el experimento para ambos grupos, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$.

Tabla 2. Actividad de calicreína urinaria (mU /mg creatininuria)

Controles	BH	BHK
Pre-inducción (PI)	23 ± 6,8	61 ± 23,5*
1° semana BSA	11 ± 3,3	17 ± 6,9
2° semana BSA	12 ± 4,1	6,1 ± 1,6*
Fin w/o	7,5 ± 1,9	31 ± 14,3*
4° semana sal	6,5 ± 3,7	18 ± 6,9**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

El grupo BHK, mostró un significativo incremento en los valores de CalU después de un mes de administración de solución rica en potasio, comprobándose así el efecto estimulador sobre la producción de CalU ($30 \pm 14,4$ vs $61 \pm 23,5$ mU calicreína/mg creatininuria, $p < 0.05$), figura 6.

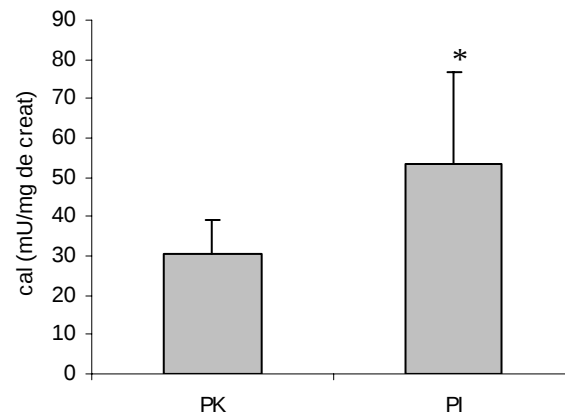


Fig. 6. Aumento en la actividad de calU (BHK), $*p < 0,05$.

4.4 Excreción de electrolitos

En las figuras 7,9 y 10 se muestran graficados los valores de excreción de potasio, cloruro y sodio urinario para los dos grupos a lo largo del experimento.

Como era de esperar, se observó una significativa **excreción de potasio** para el grupo BHK, durante todo el experimento (tabla 3). El aumento más significativo para las ratas BHK se manifestó la 1° semana de sobrecarga de proteínas y la 2° semana de dieta rica en sal. Los valores de potasio excretado por el grupo BH fueron constantes, y siempre inferiores a los mostrados por el grupo BHK.

El control realizado al grupo BHK previo a la administración de soluciones de potasio (PK), no mostró diferencia significativa con el realizado a las ratas BH previo a la administración de albúmina, (PK (BHK) $128 \pm 19,0$ vs PI (BH) $109 \pm 10,7$ uEq / mg de creatininuria, $p > 0,05$), sin embargo, luego de 4 semanas de administración de KCl se observó un aumento muy significativo en la excreción de potasio, como era de esperar (figura 8).

En la medición de **cloruros** se encontraron significativas diferencias entre los grupos (figura 9). El peak en la excreción de cloruros para el grupo BHK se detectó durante las 2 semanas de sobrecarga de proteínas, y a la 4° semana de sal-sensibilidad, en cambio, el grupo BH no sufrió mayores cambios, mostrando su máxima excreción a la 4° semana de dieta rica en sal, pero sin diferencia significativa con la medición previa a la inducción del daño TI.

Durante el período de inducción se observó una diferencia marcada entre ambos grupos, siendo la excreción de cloruros significativamente mayor en el grupo BHK (Tabla 4).

Durante las 4 semanas de hidratación rica en potasio previas a la inducción, el grupo BHK elevó significativamente los valores de cloruros excretados por la orina (PK $126 \pm 30,0$ y PI $524 \pm 95,2$ uEq /mg creatinuria) atribuibles al KCl administrado.

Los valores de **sodio urinario** (figura 10) para ambos grupos de ratas en el periodo PI no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, durante las inyecciones de albúmina, el grupo BH excretó una mayor cantidad de sodio, siendo éste significativo a la 2° semana de BSA, manteniéndose hasta el fin del periodo de w/o.

Interesantemente, al llegar al período de sal-sensibilidad esta tendencia cambia y es ahora el grupo BHK el que excreta mayores cantidades de sodio, encontrándose diferencias muy significativas a la 2° y 3° semana de dieta hipersódica. Esta diferencia se pierde al llegar a la 4° semana (tabla 5).

En los controles realizados al grupo BHK antes y después de las 4 semanas de soluciones hiperpotásicas PI, no se encontraron diferencias significativas en los valores de sodio urinario.

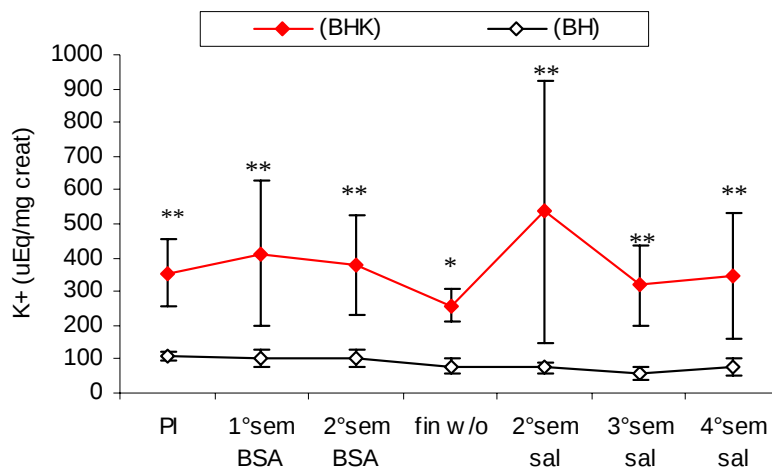


Figura 7. Excreción de potasio urinario de ambos grupos durante todo el experimento

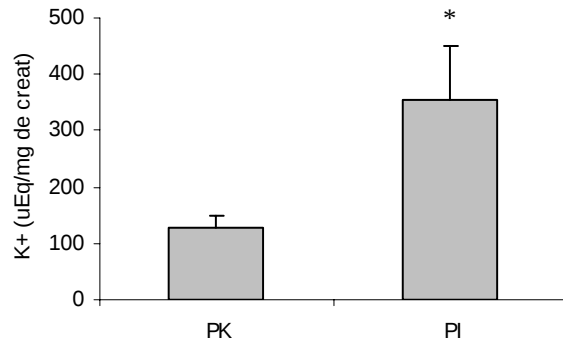


Figura 8. Excreción de Potasio urinario pre y post potasio, **p<0,005.

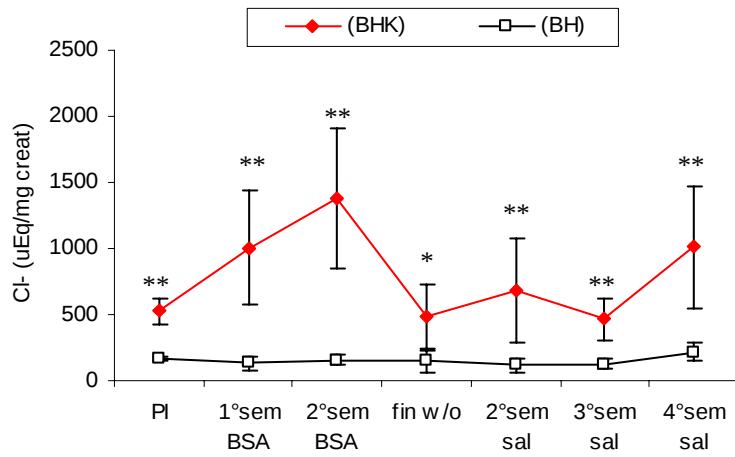


Figura 9. Excreción de cloruro urinario.

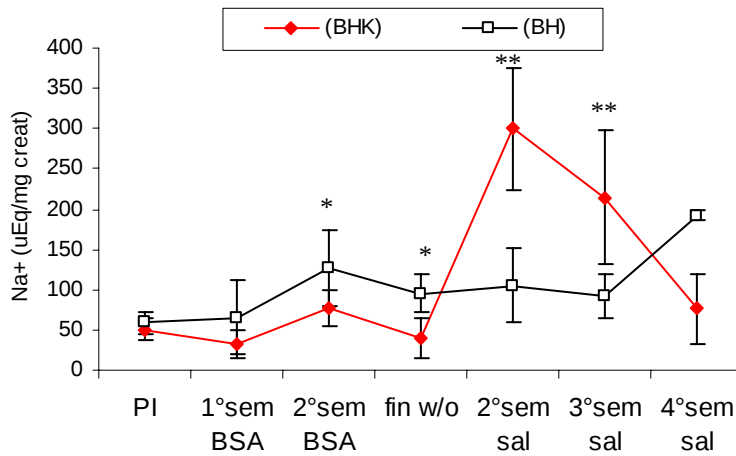


Figura 10. Excreción de sodio urinario.

Tabla 3. Excreción de **potasio** (uEq/mg creatininuria), durante el experimento.

Controles	BH	BHK
Pre-inducción (PI)	109 ± 10,7	356 ± 96,4**
1° semana BSA	103 ± 23,5	412 ± 215,6**
2° semana BSA	103 ± 24,9	376 ± 146,9**
Fin w/o	79 ± 21,5	259 ± 49,1*
2° semana sal	74 ± 18,0	536 ± 387,8**
3° semana sal	60 ± 18,6	318 ± 118,3**
4° semana sal	79 ± 24,8	345 ± 185,8**

* p<0,05; ** p<0,005.

Tabla 4. Excreción de **cloruro** (uEq/mg creatininuria), durante el experimento

Controles	BH	BHK
Pre-inducción (PI)	168 ± 17,6	524 ± 95,2**
1° semana BSA	132 ± 50,6	1007 ± 431,5**
2° semana BSA	157 ± 40,7	1379 ± 528,4**
Fin w/o	147 ± 81,7	484 ± 236,0*
2° semana sal	118 ± 50,9	683 ± 398,2**
3° semana sal	128 ± 35,7	464 ± 158,9**
4° semana sal	219 ± 70,9	1008 ± 457,5*

*p<0,05; ** p<0,005.

Tabla 5. Excreción de **sodio** (uEq/mg creatininuria), durante el experimento

Controles	BH	BHK
Pre-inducción (PI)	59 ± 13,3	51 ± 13,5
1° semana BSA	65 ± 46,8	35 ± 17,7
2° semana BSA	126 ± 47,3	77 ± 21,5*
Fin w/o	96 ± 22,7	40 ± 24,0*
2° semana sal	105 ± 46,4	300 ± 76,2**
3° semana sal	83 ± 32,9	215 ± 83,9**
4° semana sal	114 ± 75,7	76 ± 43,6

*p<0,05; ** p<0,005.

4.5 Proteinuria

Durante la administración de 2 g de seroalbúmina de bovino (BSA), se produjo intensa proteinuria en ambos grupos de ratas, aunque fue significativamente menor en el grupo BHK (figura 11). Esta diferencia fue aún más evidente a la 2ª semana de inyecciones de BSA (Tabla 6). Luego de las dos semanas de w/o, los 2 grupos se recuperaron y llegaron casi a normalizar sus proteinurias, sin diferencias significativas entre ellos. En el periodo de sal-sensibilidad, los valores de proteínas excretadas por el grupo BHK fueron significativamente menor, tanto a la 3ª como a la 4ª semana de dieta hipersódica. Es más, este grupo mostró una normalización de los valores de proteinuria alcanzando niveles semejantes al período pre-inducción. No se observó cambios en la excreción de proteína urinaria en el grupo BHK durante el mes de administración de potasio pre-inducción.

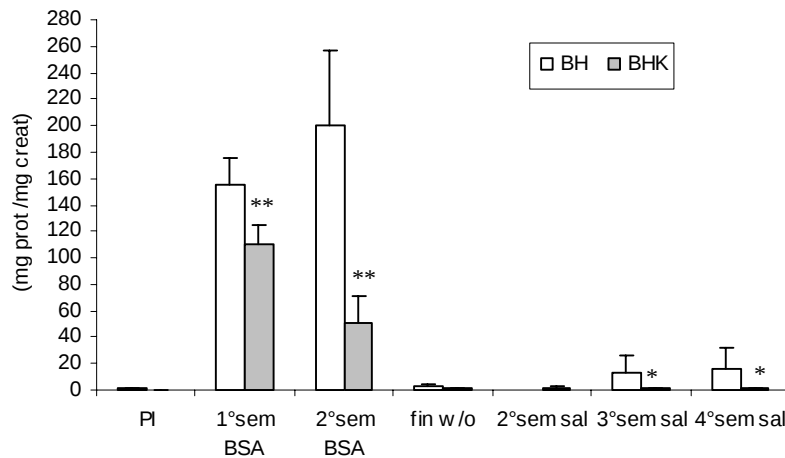


Figura 11. Excreción de proteína urinaria durante todo el experimento. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$.

Tabla 6. Valores de Proteína urinaria (mg/mg creatininuria).

Controles	BH	BHK
Pre-inducción (PI)	$0,8 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,4$
1° semana BSA	$155 \pm 20,0$	$111 \pm 14,0^{**}$
2° semana BSA	$201 \pm 56,4$	$51 \pm 20,5^{**}$
Fin w/o	$2,2 \pm 2,8$	$1,2 \pm 0,8$
2° semana sal	$1,5 \pm 1,0$	$1,4 \pm 1,9$
3° semana sal	$14 \pm 13,4$	$1,1 \pm 0,4^*$
4° semana sal	$16 \pm 15,8$	$1,4 \pm 0,9^*$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

4.6 Correlación de Spearman: Presión arterial sistólica (PAS) versus excreción de CalU durante la 4ª semana de sal, grupo BH y BHK.

Se observa una correlación inversa entre las variable estudiadas (figura 12). Los animales con presiones arteriales más bajas corresponden a aquellos con mayor excreción de calicreína urinaria.

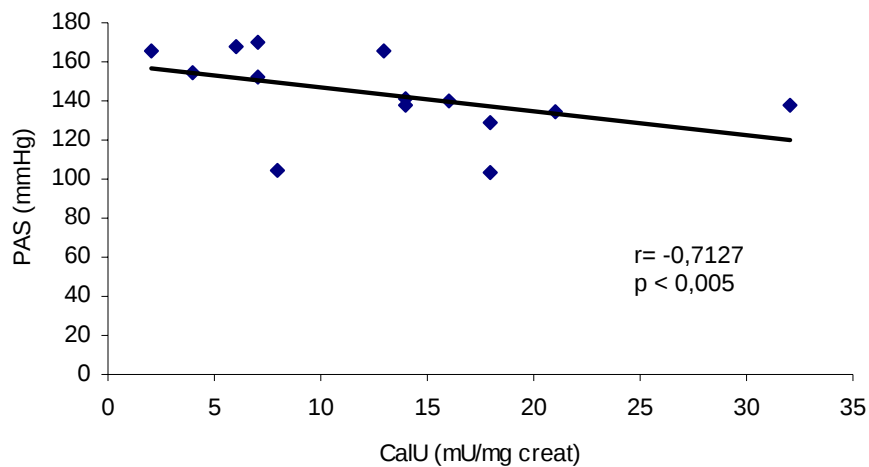


Figura 12. Correlación presión arterial sistólica vs excreción de CalU entre ratas del grupo BH y BHK, (n= 14).

5. DISCUSIÓN

En esta investigación hemos podido demostrar que la estimulación de la calicreína renal, mediante una dieta rica en potasio, es capaz de proteger de la sal-sensibilidad observada en este modelo experimental.

El modelo de sobrecarga proteica utilizado en esta tesis para evaluar la aparición de sal-sensibilidad posterior al daño túbulo intersticial, ha sido estudiado ampliamente (Eddy, 1989; Suzuki, 2001), porque es altamente reproducible e induce intenso daño renal. Existe suficiente evidencia científica que apoya el uso de este modelo para estudiar el desarrollo de HT sal-sensible asociada a daño TI (Rodríguez-Iturbe y col, 2001). Teniendo en cuenta que estudios previos reconocieron el daño del SCC en la fase de inducción de este modelo, parecía razonable plantearse que estas alteraciones podrían presentarse en la patogénesis de la sal-sensibilidad observada a posteriori.

Los resultados obtenidos **en la fase de sobrecarga proteica**, mostraron intensa proteinuria al igual que trabajos anteriores (Eddy, 1996; 1995). Una alta dosis de BSA provoca un defecto en la selectividad por tamaño de la membrana glomerular, que se traduce en proteinuria masiva y nefritis TI (Eddy, 1989). Las proteínas que atraviesan la barrera glomerular son incorporadas a las células de los túbulos proximales por endocitosis, al existir un exceso, se incrementa la ECA intrarrenal (Largo y col, 1999), el factor de transcripción nuclear- κ B (Mezzano y col, 2001), existiendo una producción anormal de citoquinas. Todo esto favorece la infiltración monocítica, fibrosis y apoptosis contribuyendo al proceso de la lesión renal. El grupo tratado con soluciones ricas en potasio, si bien presentó importante proteinuria, éste no fue tan elevado como el observado en el grupo BH. Esta reducción podría corresponder a un fenómeno de

protección renal derivada de la estimulación del SCC sin poder descartar que sea secundario sólo a las menores cifras tensionales evidenciadas por el grupo BHK.

Los valores de CalU, durante esta fase disminuyeron para ambos grupos experimentales. Reportes previos han demostrado que una estimulación del SCC por potasio es capaz de reducir la proteinuria y las cifras tensionales a la 7ª dosis de albúmina en este modelo (Ardiles, sf). Sin embargo, las mediciones de CalU efectuadas en esta tesis a los 14 días, no muestran una persistencia de esta “protección”, perdiéndose la diferencia observada a la primera semana. Esto nos permite postular que otros sistemas, involucrados en esta etapa, principalmente el SRA, sobrepasan ampliamente el posible efecto benéfico de la estimulación del SCC. Estudios previos han detectado una sobrerregulación de la ECA en los sitios de daño intersticial y sobre-expresión de angiotensina II en los mismos infiltrados (células T y macrófagos).

El grupo BH mostró una excreción de potasio y cloruro sin variaciones importantes durante el experimento. Por su parte, el grupo BHK excretó grandes cantidades de cloruro y potasio, confirmando la alta ingesta de KCl de éste grupo.

Con respecto a los valores urinarios de sodio, el grupo BH aumento su excreción a la segunda semana de inducción, sugiriendo que una retención de sodio no es patogénicamente importante en la aparición de hipertensión arterial en esta fase.

Durante la fase de wash-out, al comparar la PA en esta fase, persiste una clara diferencia entre ambos grupos, siendo más alta en el grupo BH que en el grupo BHK, el que la normalizó a niveles similares a los observados en la etapa PI. De ello podemos deducir que la administración de potasio al estimular el SCC es capaz de reducir significativamente la presión arterial en animales sometidos previamente a un daño TI.

Con respecto a la excreción de CalU, en esta fase el grupo BH continuó disminuyendo sus cifras, en tanto que el grupo BHK los aumentó significativamente, confirmando el efecto estimulador de la dieta rica en potasio. Adicionalmente, el aumento de la CalU se acompañó de una significativa menor presión arterial, confirmando el efecto hipotensor del sistema. A este nivel, dado que la proteinuria fue muy escasa, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En cuanto a los valores de proteinuria de ambos grupos lograron reducirse a valores semejantes al período PI sugiriendo que hubo recuperación notoria del daño TI.

Al llegar al período de dieta hipersódica, ambos grupos evidenciaron diferencias en cuanto a los valores de: PAS, actividad de CalU, electrolitos y proteínas excretadas.

Las PAS mostraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratas, siendo muy evidente a la 4° semana de sal, en que las ratas BH se hicieron muy hipertensas, lo que corrobora lo descrito previamente por otros autores (Rodriguez-Iturbe, 2001). Las BHK, en cambio, no manifestaron diferencias estadísticas con los valores encontrados al inicio del experimento.

En cuanto a la actividad de CalU, a la 4° semana de sal, las ratas BHK mostraron valores significativamente más altos que los del grupo BH, lo que se puede explicar por la estimulación del SCC por el potasio.

Los electrolitos urinarios también manifestaron claras diferencias entre los grupos, principalmente la excreción de sodio, y aquí llama poderosamente la atención la franca diferencia en los valores de natriuresis durante el periodo de sal-sensibilidad. Existió una clara diferencia de la excreción de sodio a la 3° y 4° semana, en que las ratas BHK excretaron significativamente más sodio que las BH, evidenciando el poder

natriurético del SCC, sugiriendo este mecanismo como uno de los involucrados en la reducción de la PS. No podemos descartar que también existiera una mayor acción vasodilatadora de las cininas y para ello resultan interesantes los experimentos en marcha para probar el efecto de un bloqueador de cininas (Icatibant) en este modelo.

La excreción de proteínas, fue significativamente mayor en el grupo BH mientras que el grupo BHK mantuvo sus valores muy cercanos a los encontrados en el control al final del w/o y durante el período PI.

Todo esto nos permite postular que una dieta rica en potasio, al menos en el modelo de sobrecarga proteica y sodio, al aumentar la producción de CalU, aumenta las tasas circulantes de cininas, provocando una acción natriurética e hipotensora protegiendo a los animales del desarrollo de sal-sensibilidad. Reforzando esta idea, resulta atractiva la fuerte correlación inversa encontrada entre CalU e hipertensión arterial. Adicionalmente nuestros resultados sugieren un eventual rol renoprotector evidenciado por una reducción significativa de la proteinuria durante diversas fases del experimento. Si bien ello podría considerarse sólo un efecto marginal atribuible a la reducción de la presión arterial, se requieren mayores estudios para su evaluación. Varios datos experimentales, involucrando entrega de genes de calicreína, muestran atenuación del daño renal en modelos animales. (Chao, 1997; Wolf, 2000). Junto a esta evidencia, los efectos beneficios de los inhibidores de la ECA, mejorando la fibrosis renal y cardiaca se han atribuido a elevados niveles de cininas ganados al bloquear la principal enzima que destruye las cininas. (Linz, 1995; Kim, 1999).

Con respecto al efecto del potasio en animales normales, resultan ilustrativos los fenómenos observados en el período de hidratación hiperpotásica, previa a la inducción

del grupo BHK. Los análisis realizados en este modelo mostraron una clara estimulación de la excreción de CalU como efecto de la dieta rica en potasio. Los altos valores de potasio excretados por las ratas BHK después de las 4 semanas de dieta hiperpotásica se asociaron a una mayor actividad de CalU. Sin embargo, los niveles de PAS no mostraron mayor variación, sugiriendo que este efecto puede ser útil solo en presencia de algún tipo de injuria renal o desbalance de los sistemas reguladores de la presión y no en animales sanos y normotensos.

Nuestras observaciones complementan información previa que demuestra un desbalance entre los mecanismos involucrados en el control de la presión arterial a favor de los componentes sal retenedores y vasoconstrictores en la patogénesis de la HT sal-sensible. Por otro lado, nuestros resultados sugieren un efecto renoprotector, control de la presión arterial y la estimulación del SCC. Finalmente estos resultados merecen ser complementados con estudios clínicos para establecer su potencial extrapolación a la enfermedad humana.

CONCLUSIONES:

1. La aparición de HTA en este modelo sugiere la importancia del daño al SCC como parte del daño TI en la génesis de la HTA nefrótica.
2. Es posible que en coincidencia con el daño TI, se produzca un desbalance con los mecanismos de regulación de la PA alojados en el espacio TI renal (SRA, endotelina, SCC, etc.)
3. La alta ingesta de potasio en la dieta, estimula la síntesis y excreción de calcitriol renal y disminuye la PA en el modelo experimental de sal-sensibilidad post sobrecarga intraperitoneal de proteína exógena.
4. El SCC juega un rol importante en la patogénesis de la HTA y sal-sensibilidad.

PROYECCIÓN DEL TRABAJO:

El presente estudio muestra un claro efecto hipotensor y reductor de la sal-sensibilidad por estímulo del SCC mediante una dieta rica en potasio. Un manejo terapéutico enfocado a proteger el SCC, ya sea estructuralmente, mediante la prevención del daño TI, o funcionalmente, mediante agentes que aumenten los péptidos vasodilatadores, podrían prevenir o atenuar el efecto de la sal en pacientes sal-sensibles y una posterior progresión hacia una enfermedad renal crónica.

Esto puede tener aplicaciones clínicas importantes en la terapia no farmacológica de la HTA esencial y asociada a daño renal parenquimatoso, en que la suplementación de sales de potasio en la dieta, aparte de reducir la ingesta de NaCl pueden beneficiar a los enfermos mediante una estimulación de un sistema vasodilatador altamente efectivo.

7. LITERATURA CITADA

- Abbate, M., Remuzzi, G. (1999) Proteinuria as a mediator of tubulointerstitial injury. *Kidney and Blood Pressure Research.*, 22: 37-45.
- Ardiles, L., Loyola, F., Figueroa, C. (sf) Modulation of renal kallikrein by a high potassium diet in rats with intense proteinuria. *Kidney International.*, In press.
- Bönner, G., Marin-Grez, M. (1981) Measurement of kallikrein activity in urine of rats and man using a chomogenic tripeptide substrate. *J Clin Chem Clin Biochem.*, 283: F1132-F1141.
- Bellini, C., Carlomagno, A., Piccoli, A., Di Francesco, L., Luparini, R., Germano, G., Giarrizzo, C., Santucci, A., Balsano, F. (1993) Oral administration of extracted Kallikrein to patients with essential arterial hypertension. *Clin. Ter.*, 139: 3-8.
- Berthoud, V., Corthorn, J. (1987) Specificity of the amidase and kininogenase methods for the determination of rats urinary kallikrein. *J Clin Chem Biochem.*, 25: 560-600.
- Bhoola, K. D; Figueroa, C. D.; Worthy, K. (1992) Biorregulation of kinins, kininogens and kikinases. *Pharmacol Rev.*, 44:1-81 .
- Campese, VM. 1994. Salt sensivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications (clinical conference). *Hypertension.*, 23:531-550.
- Chao, J., Chao, L. Experimental kallikrein gene therapy in hypertension, cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Res.*, 35: 517-522.
- Eddy, AA. (1989) Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am J Pathol.*, 135: 719-733.
- Eddy, AA., Giachelli, CM. (1995) Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int.*, 47: 1546-1557.
- Eddy, AA., Giachelli, CM. (1996) Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.*, 7: 2495-2508.
- El-Dahr S, Dipp S, Yosipiv I, Carbin L (1998) "Activation of Kininogen Expresion During Distal Nephron Differentiation". *American Journal of Physiology-Renal Physiology.*, 275 Issues: 1 F173-F182.
- Figueroa, C.D., Caorsi, I., Subiabre, J., Vío, C.P. (1984) Inmunoreactive kallikrein localization in the rat kidney: an Inmunolectron-Microscopic Study. *Journal of Histochemistry and Citochemistry.*, 32(1) : 117-121.

- Ferri, C., Bellini, C., Carlomagno, A., Baldoncini, R., De Siati, L., Perrone, A., Santussi, A., Balsano, F. (1993) Urinary kallikrein excretion and plasma atrial natriuretic peptide in human salt-sensitive hypertension. *J Hypertens.*, 11 (Suppl 5): S212-S213.
- Florin, M., Lo, M., Liu, K., Sassard, J. (2001) Salt sensitivity in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. *Kidney Int.*, 59 (5): 1865-1872.
- Ganong, W. (1998) Fisiología Médica. 10ª ed. Editorial El Manual Moderno. S.A- ciudad de México.
- Guyton, A. (2002) Manual de fisiología médica. 10ª ed. Editorial McGraw, Hill- International de España.
- Hayashi I, Fujita T, Majima M, Katori M. (1999) A secretory mechanism of renal Kallikrein by a high potassium ion; a possible involvement of ATP- sensitive potassium channel. *Inmunopharmacology* october., 44 (1-2): 49-55.
- Houssey, B., Cingolani, H. (2001) Fisiología Humana. 7ª ed. Editorial El Ateneo. Buenos Aires Argentina.
- Izzo, J. Black, H.R. (1999) Hypertension Primer. 2ª ed. *American Heart Association*. Dallas, Texas., 48:123-124.
- Johnson, R., Herrera, J., Schreiner, G., Rodríguez, B. (2002) Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med.*, 346(12): 913-923.
- Katori, M., Masataka, M. (1996) Pivotal role of renal kallikrein-kinin system in the development of hypertension and approaches to new drugs based on this relationship., *Jpm J Pharmacol.*, 70 (2): 95-128.
- Katori, M., Majima, M., Hayashi, I. (1998) Crucial suppressive rol of renal kallikrein-kinin system in the development of salt-sensitive hypertension., *Biol Res.*, 31 (3) 143-149.
- Kim, N.N., Villegas, S., Summerour, S.R., Villarreal, F.J. (1999) Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol.*, 31: 457-466.
- Largo, R., Gomes, G., Soto, K., Marron, B., Blanco, J., Gazapo, R.M., Plaza, J.J., Egido, J. (1999) Angiotensin- converting enzyme is upregulated in the proximal tubules of rats with intense proteinuria. *Hypertension.*, 44: 1-80.

- Largo, R., Gomez, G., Soto, K., Marron, B., Blanco, J., Gazapo, RM., Plaza, JJ., Egido, J. (1999) Angiotensin- converting enzyme is upregulated in the proximal tubules of rats with intense proteinuria. *Hypertension.*, 33: 732-739.
- Linz, W., Wiener, G., Gohlke, P., Unger, T., Scholkens, BA. (1995) Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin- converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev.*, 47: 25-49.
- Makoto, K., Masataka, M. (2003) 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.
- Meani, A., Fabris, C., Vianello, D. (1985) A kinetic assay for Human urinary Kallikrein determination. *Enzyme.*, 33: 89-93.
- Mezzano, S., Barría, M., Droguett, M., Burgos, M., Ardiles, L., Flores, C., y col. (2001) Tubular NF-kB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int.*, 60: 1366-1377.
- Morimoto, A., Uzu, T., Nishimura, M., Kuroda, S., Nakamura, S., Inegata, T., Kimura, G. (1997) Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hipertensión. *Lancet.*, 350: 1734-1737.
- Obica, LF. (1987) Urinary kallikrein after potassium adaptation in the rat. *Arch Int Physiol Biochem.*, 95: 189-193.
- Penschow, JD., Bulmer, B. (1998) Effects of diuretics on renal kallikrein gene expression in rats. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol (suppl.)*, 25S: 86-90
- Quiroz Y, Nava M, Pons H, Rodríguez-Iturbe B. (2002) Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 283(5): F1132-1141.
- Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera A, Gomez G, Largo R, Egidio J, Jonhson RJ, Rodríguez I. (2001) Mycophenolate mofetil prevents salt- sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 281:F38-F47.
- Suzuki, T., Katori, M., Fujita, T., Kumagai, Y., Majima, M. (2000) Involvement of the renal kallikrein-kinin system in K(+)- induced diuresis and natriuresis in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 399: 223-227.
- Suzuki, Y., López-Franco, O., Gomez-Garre, D., Tejera, N., Gomez-Guerrero, C., Sugaya, T., Bernal, R., Blanco, J., Ortega, L., Egido, J. (2001) Renal tubulointerstitial

damage caused by persistent proteinuria is attenuated in AT1-Deficient mice. Role of endothelin-1. *Am J of Pathol.*, 159: 1895-1904.

- Rodríguez, I., Pons, H., Quiroz, Y., Gordon, K., Rincón, J., Chavez, M., Parra, G., Herrera, A., Gomez, G., Largo, R., Egido, J., Jonson, RJ. (2001) Mycophenolate mofetil prevents salt- sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. *Kidney Int.*, 59:2222-2232.
- Rodríguez-Iturbe, B., Pons, H., Herrera-Acosta, J., and Jonson, RJ. (2001) The role of immunocompetent cells in nonimmune renal disease. *Kidney Int.*, 59: 1626-1640
- Sharma, J., Uma, K., Noor, A., Rhaman, A. (1996) Blood pressure regulation by kallikrein-kinin system. *Gen Pharmacol.*, 27: 55-63.
- Thomas, ME., Brunskill, NJ., Harris, KP., Bailey, E., Pringle, JH., Furnes, NP., Walls J. (1999) Proteinuria induces tubular cell turnover: A potential mechanism for tubular atrophy. *Kidney Int.*, 55: 890-898.
- Vío C P, Figueroa CD. (1987) Evidence for a stimulatory effect of high potassium diet on renal Kallikrein. *Kidney Int.*, 31: 1327-1334.
- Vío, C.; Loyola, S.; Velarde, V. (1992) Localization of components of the Kallikrein-Kinin System in the kidney: relation to renal function. *Hypertension.*, 19(2):10-16.
- Weening, J., Van Guldener, C., Daha, M., Klar, N., Van Der Wal, A., Prins, F. (1987) The pathophysiology of protein-overload proteinuria. *Am J of Pathol.*, 129 (1): 64-73.
- Weinberger, M. (1996) Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension.*, 27: 481-490.
- Xiong, W., Chao, L., Chao, J., (1989) Renal kallikrein mRNA localization by in situ hybridization. *Kidney Int.*, 35:1324-1329.
- Zinner, S., Margolius, S., Rosner, B. (1976) Familial aggregation of urinary kallikrein concentration in childhood: relation to blood pressure, race and urine electrolytes. *Am J. Epidemiol.*, 104: 124-132.

8. ANEXOS



Anexo 1. Balanza Schoenle.



Anexo 2. Toma de presión arterial sistólica. Se puede ver la caja de inmovilización, equipo de ultrasonido Doppler, manguito de goma, transductor y esfigmomanómetro.



Anexo 3. Sala de recolección de muestras de orina, jaulas metabólicas.



Anexo 4. Jaula metabólica, en donde se aloja a la rata por 24 horas, solo con hidratación.

Anexo 5. Método para la determinación de calicreína activa en orina

Preparación de las muestras: Las muestras fueron descongeladas colocándolas a 4°C por 12 horas. Luego 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 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 SBTI-EDTA (Inhibidor Tripsínico De Soya 1,5mg/ml y EDTA 1,9 mg/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 min. 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.