



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

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

“EFECTO HIPOTENSOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE KCl, EN EL MODELO DE SAL-SENSIBILIDAD POR INHIBICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO”

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

MARCIA GABRIELA ADRIAZOLA COSSIO

VALDIVIA - CHILE

2008

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	38
ANEXOS.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	45

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. Se ha descrito la aparición de sal-sensibilidad posterior al daño TI en éste modelo.

Objetivos: Esta investigación pretende analizar si la administración de una dieta rica en potasio puede proteger de la sal sensibilidad.

Materiales y método: Se utilizaron 18 ratas machos de la cepa Sprague Dawley. Se distribuyeron al azar en dos grupos, los cuales tuvieron un periodo de inducción del daño, mediante L-NAME por 3 semanas, luego un tiempo de descanso o wash out de una semana, para finalizar con cuatro semanas de dieta alta en sal. Un grupo, el NSK recibió KCl (cloruro de potasio) al 1% durante todo el experimento, a diferencia del NS. El L-NAME fue administrado en dosis de aproximadamente 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 (CaIU) a través de un método amidásico.

Resultados: El grupo tratado con potasio, mostró una disminución significativa en la presión arterial, pero no así un aumento significativo en la excreción de CaIU.

Conclusión: La administración de una dieta rica en potasio, es capaz de proteger de la hipertensión sal sensible independiente de la actividad del SCC.

SUMMARY

The renal Kallikrein Kinin System (KKS) is a multienzymatic system 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. Many studies have shown the apparition of salt-sensitivity posterior damage TI in this model.

Objectives: This study was designed to evaluate the administration high potassium diet may protect of the salt sensitivity.

Materials and methods: Eighteen male Sprague Dawley rats were randomly separated in 2 groups: NS (L-NAME treated and high salt diet) and NSK (KCl, L-NAME treated and high salt diet). L-NAME was administered in dose of about 116 mg/Kg. Systolic blood pressure measured and urine collections were obtained for the enzymatic urinary activity of kallikrein determination by the amidasic method.

Results: The group treated with potassium, showed a significant decrease in the systolic BP, but not a significant increase in KU.

Conclusion: The administration of high potassium diet, is capable to protect salt-sensitivity hypertension, independent of KKS activity.

INTRODUCCIÓN

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. (Peña, 2001)

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra la pared arterial y se expresa a través de las diferentes técnicas de medición como presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD). Con frecuencia se señala que la presión arterial es igual al producto del gasto cardiaco por la resistencia periférica total y ambos la controlan. (Ganong, Guyton)

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)

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)

Existe un sistema integrado de múltiples facetas para la regulación de la presión arterial y son las siguientes: (Guyton)

1. Los mecanismos de acción rápida en segundos o minutos: Casi en su totalidad corresponden a respuestas nerviosas y son el sistema de retroacción de los barorreceptores, el mecanismo isquémico del SNC y el mecanismo quimiorreceptor. Éstos mecanismos ante un alza aguda de la presión se combinan para:
 - ❖ Causar una dilatación de las venas y disminuir la carga de sangre al corazón.
 - ❖ Causar una disminución de la frecuencia y contractibilidad cardíaca, dándole al corazón una menor capacidad de bombeo.
 - ❖ Causar una dilatación de las arteriolas para facilitar que la sangre salga de las arterias.

Estos mecanismos actúan casi instantáneamente y si la presión arterial cae bruscamente reaccionan en la dirección opuesta devolviendo la presión al rango normal.

2. Los mecanismos de tipo intermedio: Éstos corresponden al sistema vasoconstrictor de la renina-angiotensina, la relajación de estrés de la vascularización y el desplazamiento de líquido a través de las paredes de los capilares dentro y fuera de la circulación para reajustar el volumen sanguíneo según necesidad. Estos mecanismos

se activan entre 30 minutos y varias horas, durando su efecto largos períodos de días en caso necesario.

3. Los mecanismos de control a largo plazo: Estos corresponden al mecanismo renal de regulación del volumen de los líquidos corporales con interacciones entre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema nervioso y varios otros factores que confieren capacidades de control especiales para finalidades especiales. Éste mecanismo ha demostrado que necesita unas pocas horas para mostrar una respuesta significativa.

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 CO₂, K⁺, adenosina, lactato.
- ❖ Disminución del O₂.
- ❖ 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.

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).

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).

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 tubulointerstitial, 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.

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 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 esta 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).

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).

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)

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)

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)

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)

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 anomalías morfológicas renales. (Salas y col., 1999)

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)

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)

Existen opiniones que la reducción de la actividad del sistema Calicreína-Cinina renal puede ser un marcador de una agresividad de la hipertensión arterial esencial (Campese, 1994).

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; Olmo, 2006; Weinberger, 1996)

Cabe señalar que en muchos modelos experimentales de hipertensión, como es el caso del modelo de hipertensión renovascular Goldbaltt, 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)

Existen varios métodos para medir calicreína los que se diferencian considerablemente en especificidad y sensibilidad. Para la cuantificación en orina o saliva, se recomiendan los análisis de actividad usando los substratos sintéticos o los que miden la cantidad a través de radioinmunoensayos (RIA) fotométricos. Las muestras del jugo pancreático y duodenal tienen que ser analizadas con el RIA o el análisis biológico después de la activación y adición de

inhibidores de tripsina. Hasta el momento, las muestras del plasma se pueden analizar solamente con el RIA (Colowick y col., 1981).

En 1955 se postuló que existe una estrecha relación entre calicreína urinaria (CaIU) 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 CaIU, 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).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hipertensión arterial es en nuestro país, una afección de alta prevalencia y elevada morbi-mortalidad. Uno de los factores importantes relacionados con ésta patogenia es la sensibilidad a la sal, junto con ella se manifiesta una elevación de la presión arterial cuando varía la cantidad de sal ingerida en la dieta. También es importante poder estudiar la acción antagónica vasodilatadora y natriurética que cumple el Sistema Calicreína-Cininas Renal (SCC).

Este trabajo incluye un modelo animal, en el cual se estudia principalmente el efecto de una dieta rica en potasio y su potencial efecto hipotensor en el modelo de hipertensión arterial sal-sensible inducida por el daño TI secundario a la inhibición de la síntesis de óxido nítrico con L-NAME.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La administración de soluciones de potasio a ratas Sprague Dawley con daño túbulo intersticial secundario a la inhibición de la síntesis de óxido nítrico con L-NAME (N-nitro-L-arginina-metil-ester), reduce la presión arterial, protegiendo de la sal sensibilidad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto hipotensor de la administración de KCL, sobre la sal sensibilidad observada en el modelo de inhibición de la síntesis del óxido nítrico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demostrar que la administración continua de una dieta rica en potasio estimula al Sistema Calicreína Cininas renal, evaluado a través de la medición de la actividad de calicreína urinaria.

Analizar los cambios de presión arterial durante los distintos períodos del modelo, evaluando el posible efecto hipotensor de la administración de soluciones de cloruro de potasio (KCl) .

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Material biológico:

Se utilizaron como animales de experimentación ratas machos de la cepa Sprague Dawley, con un peso inicial de aproximadamente 300 gramos de peso, alrededor de 12 semanas de edad 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. Además se alimentaron e hidrataron ad libitum.

Material farmacológico:

- ❖ N-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME).
- ❖ Éter (Merck ®).
- ❖ Agua de la llave.
- ❖ Solución salina isotónica NaCl 0.9 %.
- ❖ Cloruro de Potasio, KCl (Merck ®).
- ❖ Cloruro de Sodio (Sal Lobos ®).

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(Human Test) ®.

Materiales para determinación de Calicreína 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) (Sigma T-9128).
- ❖ Ácido acético 50% v/v (Merck ®).
- ❖ Espectrofotómetro Shimadzu ®.

Otros materiales

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

Preparación de la solución de L-NAME e inhibición de la síntesis de NO:

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 aproximadamente 116 mg/kg/día. La solución fue renovada en forma diaria para los grupos en estudio 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 hiperosmótico 4%:

El pellet normosmótico 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 hiperosmótico se preparó con una solución de NaCl, la cual se agregaba al pellet normosmótico 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 hiperosmótico.

Método

Condiciones experimentales:

El experimento consta de un total de 8 semanas. Las tres primeras semanas fueron de inducción de daño, luego se continuó con un periodo de descanso (wash out) de una semana y por último las cuatro semanas restantes fueron de sobrecarga de sal en la dieta. Se conformaron 2 grupos experimentales.

Las fases experimentales incluyen:

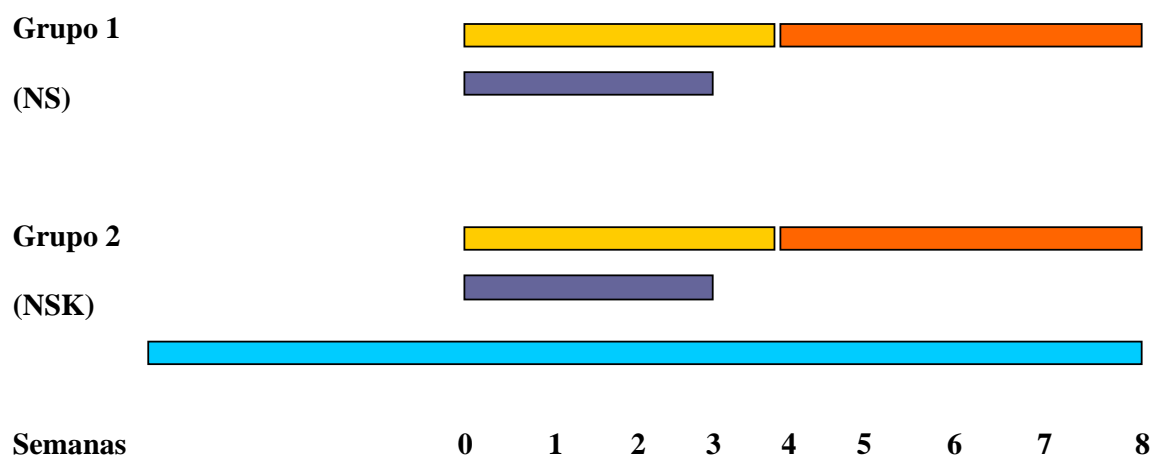
- ❖ La inducción del daño túbulo intersticial.
- ❖ Un período en que se retira la noxa (wash-out).
- ❖ Un período de manipulación en la ingesta de sal, para así evidenciar la sal dependencia de la presión arterial.

Grupos experimentales:

Grupo 1 NS (n=10 animales): grupo L-NAME y dieta hipersódica, el L-NAME fue administrado en agua de la llave a una concentración de 700 mg/L (2.6 mM) (Quiroz y col., 2001) para así obtener una dosis de aproximadamente 116 mg/kg/día, esta solución se entregó a los animales durante las tres primeras semanas del experimento. Una vez finalizada la fase de inducción del daño y durante un período de 7 días (wash out), se suspendió la administración de L-NAME y los animales recibieron alimentación e hidratación normosódica. Las cuatro semanas restantes, los animales ingirieron dieta hipersódica mediante pellet tratado con sal de mesa (NaCl) a una concentración de 4% p/p.

Grupo 2 NSK (n=8 animales): grupo L-NAME, dieta hipersódica y cloruro de potasio, los animales recibieron el mismo tratamiento experimental que el grupo NS, con la diferencia que recibieron soluciones de cloruro de potasio al 1% p/v en el agua de bebida durante todo el experimento, para así evitar una sobrecarga excesiva de cloruros.

PROTOCOLO DE ACTIVIDADES SEGÚN GRUPOS




Mes de estimulación SCC


 Dieta normosódica

 Dieta hipersódica

 L-NAME

 KCL 1%

 Control de presión arterial

 Caja metabólica

 Control de peso

 Sacrificio

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

Se evaluó el peso corporal, presión arterial, 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 Söehle, 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: esto se hizo para la determinación de creatininuria y calicreína urinaria en jaulas metabólicas individuales, la orina fue recogida en contenedores identificados, con embudos provistos de filtro para evitar la contaminación por deposiciones. Además los animales durante este periodo tuvieron acceso libre al agua pero no así al alimento, esto también se hizo para evitar contaminación por deposiciones. Al recolectar toda la orina, se midió el volumen de esta de cada rata y las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Nefrología del Hospital Regional de Valdivia.

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 ® y se expresa en mU/mg creatinina/24 hrs.

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 diferencias 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.

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 0.05; siendo significativo un $p < 0.05$. 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.

Se observa que en todos los controles se manifiestan diferencias significativas entre ambos grupos, a excepción del control basal.

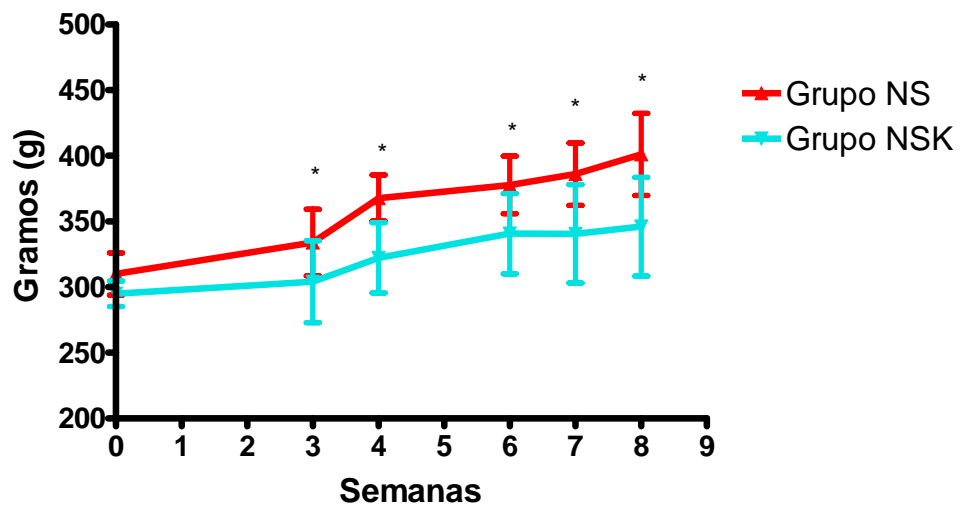


Gráfico n° 1 Peso corporal promedio (PCP) y su desviación estándar (DE), para los grupos en estudio durante los días de medición de presión arterial del experimento expresado en gramos.

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

Controles	NS	NSK
Basal	310.0 ± 16.1	294.9 ± 9.7
Semana 3 (fin inducción)	333.9 ± 25.4	304.1 ± 31.2*
Semana 4 (fin WO)	367.8 ± 17.6	322.3 ± 26.8*
Semana 6	377.8 ± 21.9	340.7 ± 30.6*
Semana 7	386.0 ± 23.7	340.5 ± 37.5*
Semana 8	401.0 ± 31.2	346.0 ± 37.6*

*p < 0.05 (vs grupo NS)

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA.

En la figura se observa diferencias significativas entre los grupos durante la tercera semana de inducción, que es donde se produce la injuria, siendo mayor la presión arterial en el grupo NSK., y también en la semana 8 post sobrecarga de sal en la dieta, siendo inferior la presión arterial para el grupo NSK, revirtiéndose el efecto anterior.

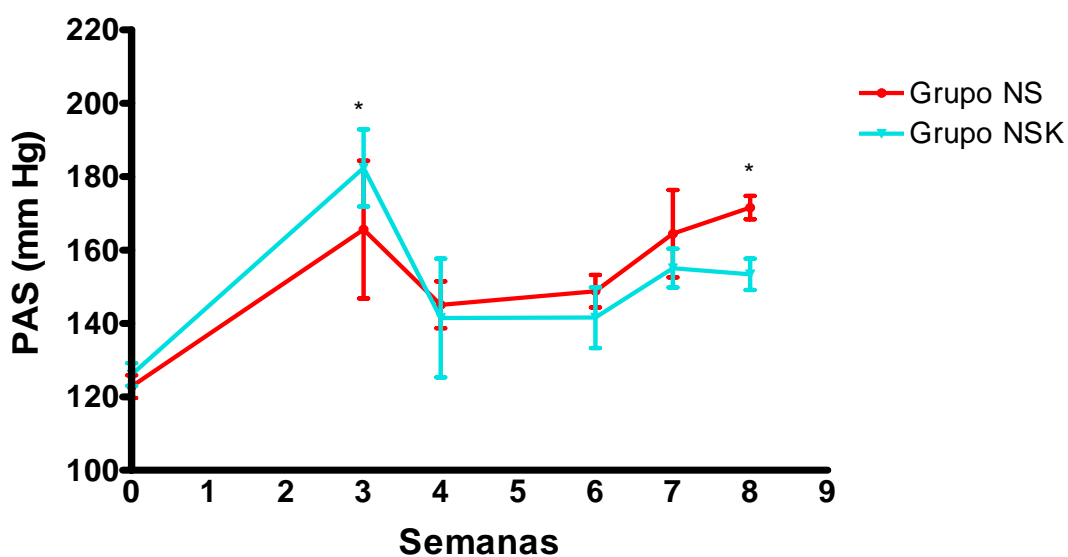


Gráfico n° 2 Presión arterial sistólica promedio (PASP) en ratas tratadas con dieta rica en potasio, L-NAME más dieta hipersódica (NSK), y con L-NAME más dieta hipersódica (NS), expresada en mm Hg.

Tabla n° 2. Presión arterial sistólica promedio (PASP) y su desviación estándar (DE), para los grupos en estudio expresado en mm Hg.

Controles	NS	NSK
Basal	122.8 ± 3.1	126.1 ± 3.1*
Semana 3	165.6 ± 18.8	182.4 ± 10.5
(Fin inducción)		
Semana 4	145.1 ± 6.4	141.5 ± 16.2
(Fin WO)		
Semana 6	148.8 ± 4.4	141.6 ± 8.3
Semana 7	164.5 ± 11.9	155.1 ± 5.3
Semana 8	171.6 ± 3.2	153.4 ± 4.3 *

* p < 0.05 (vs grupo NS)

ACTIVIDAD DE CALICREINA URINARIA

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

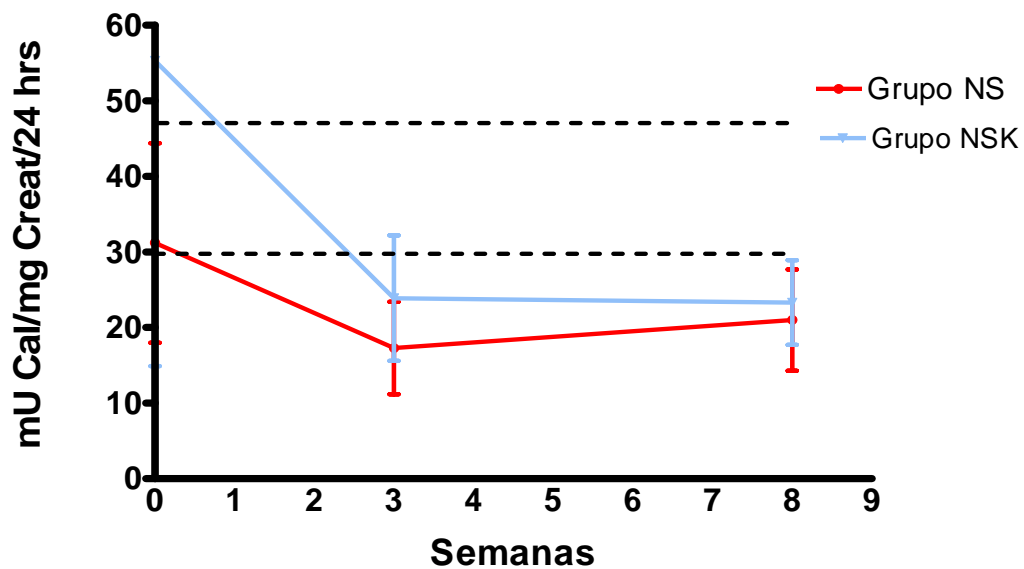


Gráfico n° 3 Actividad de Calicreína urinaria en los grupos experimentales NS y NSK, expresado en miliunidades por miligramos de creatinina en 24 horas (mU/mg creatinina/24 hrs). Línea punteada indica rango de normalidad para ratas control sanas.

Tabla nº 4. Actividad de calicreína urinaria y su desviación estándar (DE), para los grupos en estudio expresado en miligramos de proteínas por miligramos de creatinina en 24 horas.

Controles	NS	NSK
Basal	31.2 ± 13.2	55.3 ± 40.4
Semana 3 (Fin inducción)	17.3 ± 6.1	23.9 ± 8.3
Semana 8	27.2 ± 13.0	23.3 ± 5.6

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)

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 Caliceína-Cininas observado en este modelo.

Al realizar un análisis comparativo entre los dos grupos en estudio, se observó que ambos mostraron un aumento gradual de peso desde el control basal hasta la semana 8 del experimento. El normal aumento de peso observado nos permite afirmar que esta cepa presenta una buena tolerancia a las noxas utilizadas en este modelo experimental.

Los dos grupos experimentales comenzaron el experimento con valores de presiones basales normales, situación en la que los animales estaban recibiendo alimento y agua ad libitum y no habían sido expuestos a la administración de L-NAME.

Al llegar a la semana 3, se observó un aumento en los valores de la presión arterial para ambos grupos. Este aumento en los valores de PAS durante el período de inducción, 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 como los componentes del sistema renina-angiotensina.

Se puede observar que al llegar al final de la semana 4, fin del Wash Out en donde se ha retirado la noxa, los valores de las presiones bajan considerablemente.

Durante las semanas siguientes (6,7 y 8), en la que se comenzó a administrar dieta hipersódica, se comenzaron a elevar gradualmente los valores de la presión arterial para ambos grupos, lo que demuestra la aparición de hipertensión arterial sal sensible. También en este análisis es importante resaltar que las presiones para el grupo NSK después de haber retirado la noxa y partiendo desde la semana 4, hasta la 8 siempre fueron inferiores al grupo NS, siendo en la última semana considerada estadísticamente como diferencia significativa, lo que nos demuestra la reducción en la sal-sensibilidad ejercida por la administración de sales de potasio (Rojas, 2006).

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 (Olmo,2006), 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 los grupos en estudio se observó que si bien no hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados, el grupo NSK presenta valores por encima de los normales esperados, lo que se atribuye a la administración de las soluciones de potasio lo que pudiese producir una estimulación sobre el SCC, para el control basal. Esta diferencia lamentablemente no pudo ser demostrada estadísticamente dada la amplia variabilidad de los valores demostrados por los animales. Durante la tercera semana (fin inducción) se produjo una disminución considerable de los valores de calicreína urinaria, hecho atribuible al daño TI inespecífico producido por la inhibición de la producción de NO en ambos grupos. Para el grupo NSK se obtienen valores un poco más elevados de calicreína urinaria en lo que resta del experimento, lo que se debería a que este grupo sigue recibiendo potasio en su dieta. Sin embargo nuevamente no observamos diferencias significativas lo que habla probablemente de que la dosis de potasio elegida no fué suficiente.

A este respecto es importante decir que las concentraciones que han demostrado efecto estimulante del SCC son en general más cercanas al 2% y que 1% puede ser insuficiente. Sin embargo esta decisión se basó en evitar los riesgos de hiperkalemia por insuficiencia renal en un modelo muy agresivo en ese aspecto. Tal vez si se hubiese aumentado el tiempo de estudio en el período de sal sensibilidad de cuatro semanas, se podría

haber manifestado una recuperación del SCC, teniendo como consecuencia un aumento en los valores de la actividad de caliceína urinaria.

También es importante acotar que estas concentraciones de potasio podrían estimular al receptor B₂, produciendo una disminución en la PA, pero sin restaurar claramente la excreción de caliceína urinaria, pudiendo ser éste más sensible a esa concentración que la síntesis de caliceína, y por lo tanto sea éste estímulo el causante de la reducción de la presión arterial.

CONCLUSIONES

- ❖ 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.
- ❖ El trabajo experimental, permite demostrar el efecto hipotensor de la administración de KCL a ratas sal-sensibles secundario a daño tubulo intersticial por inhibición de la síntesis del óxido nítrico.
- ❖ Éste efecto hipotensor no es mediado por la estimulación de la síntesis de calicreína dada la ausencia de diferencias significativas en los valores de calicreína urinaria durante todo el experimento.
- ❖ La explicación del porqué no se logró estimular suficientemente al SCC, estaría en que la dosis de KCL administrado fué inferior a las administradas en otros modelos en que sí ha sido efectiva (2% por un mes antes, durante la inducción del daño y wash out).(Rojas, 2006)
- ❖ El SCC se analiza habitualmente a partir de la evaluación de la calicreína urinaria, debido a que la medición de cininas es muy difícil porque tienen vida media muy corta. Sin embargo pudiese ser que la estimulación del receptor B2 de cininas sea más sensible que la síntesis de calicreína. Pero lamentablemente la evaluación de éste mediador vascular no estuvo incluido dentro de los objetivos de la tesis.
- ❖ Todo lo anterior nos sugiere la importancia que pueden tener maniobras farmacológicas y no farmacológicas, como una dieta rica en potasio que si bien no logró aumentar la actividad de la calicreína urinaria de forma significativa, si logró un definitivo efecto hipotensor cuyos mecanismos y beneficios deberán ser clarificados en futuros experimentos.

PROYECCIÓN DEL TRABAJO

- ❖ Éste trabajo experimental muestra un efecto hipotensor y reductor de la sal-sensibilidad mediante una dieta rica en potasio. Este resultado puede tener aplicaciones clínicas importantes en la terapia no farmacológica de la hipertensión arterial esencial, mediante la suplementación de sales de potasio en la dieta, reduciendo así la ingesta de sodio.

- ❖ Ampliar los estudios y conocimientos sobre los diferentes mecanismos vasodilatadores (especialmente el SCC), ya que su estimulación podrían prevenir o atenuar el efecto de la sal en pacientes sal-sensibles, evitando así la progresión hacia una enfermedad renal crónica.

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 μ l 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

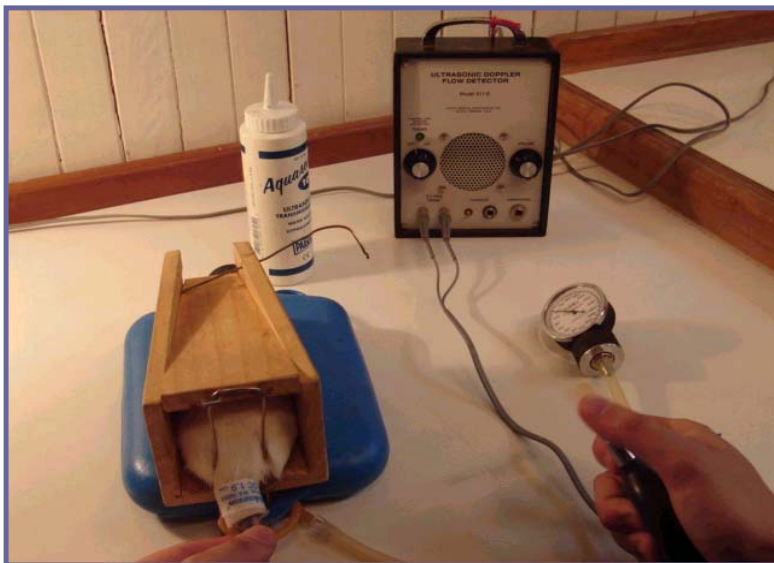
Fotografía N° 1. Bioterio de Histología y Patología, lugar donde se encontraban los animales durante todo el experimento.



Fotografía N° 2 Jaulas en donde se mantuvo a los animales separados según grupos (n = 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.



Fotografia N° 5 Balanza Söehle



BIBLIOGRAFÍA

- ❖ 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.
- ❖ Campese, VM. 1994. Salt sensivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications (clinical conference). *Hypertension.*, 23:531-550.
- ❖ 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.
- ❖ 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.

- ❖ 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.; (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. *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.
- ❖ Maddedu, 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.
- ❖ Maddedu, 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.

- ❖ 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.
- ❖ 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.
- ❖ Mountokalakis, T., (1997) The renal consequences of arterial hypertension. *Kidney International*, 51, 1639-1653.
- ❖ Obica, LF. (1987) Urinary kallikrein after potassium adaptation in the rat. *Arch Int Physiol Biochem.*, 95: 189-193.
- ❖ Ojeda, A. (2004) La estimulación del sistema calicreína-cinina (SCC) con una dieta rica en potasio previene la hipertensión arterial (HTA) asociada al daño renal inducido por proteinuria.
- ❖ 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.
- ❖ Olmo, I. (2006) Estandarización de un modelo de hipertensión sal sensible luego de daño túbulo intersticial por L-NAME. Tesis, Escuela de Química y Farmacia Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- ❖ Penschow, JD., Bulmer, B. (1998) Effects of diuretics on renal kallikrein gene expression in rats. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol (suppl.)*, 25S: 86-90

- ❖ Peña, E.; Contreras, F.; Fouillieux, C.; Montero, E.; Cabrera, J.; Ospino, N. (2001) Ejecución de un programa para reforzar el conocimiento del control de los factores de riesgo modificables de hipertensión arterial en los trabajadores de pequeña oficina principal. *Revista de la facultad de medicina Caracas* 24 (2): 172-180.
- ❖ 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.
- ❖ 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>
- ❖ Rojas, J. (2006) Protección antihipertensiva del sistema calicreína cininas renal en un modelo animal de sal-sensibilidad. Tesis, Escuela de Química y Farmacia Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- ❖ 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.
- ❖ 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.
- ❖ Tresguerres, J., Aguilera, E., Cachafeiro, V., Cardinali, D., Gil, P., Lahera, V., Martínez, J., Mora, F., Rodríguez, R., Romano, M., Tamargo, J., Zarco, P., (1999) *Fisiología Médica*. 2ª Ed., Editorial McGraw Hill. Interamericana. España.
- ❖ Vio 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.
- ❖ Weinberger, M. (1996) Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension.*, 27: 481-490.
- ❖ Zatz, R., Baylis, C., (1998) Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32, 958-964.
- ❖ 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.