

**UNIVERSIDAD DE GRANADA. FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL DE LOS MEDIADORES ENDOTELIALES Y DEL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES DE  
LA DISFUNCIÓN TIROIDEA**

Juan Manuel Moreno Ayuso

Granada, 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Juan Manuel Moreno Ayuso  
D.L.: Gr. 1694 - 2005  
ISBN: 84-338-3594-7

**JOSÉ FÉLIX VARGAS PALOMARES, CATEDRÁTICO DEL  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE  
GRANADA**

**Certifica:** Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **Papel de los Mediadores Endoteliales y del Estrés Oxidativo en las Alteraciones Cardiovasculares de la Disfunción Tiroidea**, presentada por Juan Manuel Moreno Ayuso, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 26 de septiembre de 2005

Fdo. José Félix Vargas Palomares



**ANTONIO OSUNA ORTEGA, JEFE DE SECCIÓN DE NEFROLOGÍA  
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES**

**Certifica:** Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **Papel de los Mediadores Endoteliales y del Estrés Oxidativo en las Alteraciones Cardiovasculares de la Disfunción Tiroidea**, presentada por Juan Manuel Moreno Ayuso, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 26 de septiembre de 2005

Fdo. Antonio Osuna Ortega



**JUAN SAINZ PÉREZ, DOCTOR EN FISIOLÓGÍA EN LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Certifica:** Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **Papel de los Mediadores Endoteliales y del Estrés Oxidativo en las Alteraciones Cardiovasculares de la Disfunción Tiroidea**, presentada por Juan Manuel Moreno Ayuso, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 26 de septiembre de 2005

Fdo. Juan Sainz Pérez





Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en:

- Moreno JM., Wangensteen R., Sainz J., Rodríguez-Gómez I., Chamorro V., Osuna A., Vargas F. Role of Endothelium-derived relaxing factors in the renal response to vasoactive agents in hypothyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E182-E188, 2003.
- Moreno JM., Rodríguez-Gómez I., Wangensteen R., Osuna A., Vargas F. Cardiac and Renal Antioxidant Enzymes and Effects of Tempol in Hyperthyroid Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (en prensa), 2005.



*A Noelia y Claudia*



### **Agradecimientos:**

A los directores de esta tesis, D. José Félix Vargas Palomares, D. Antonio Osuna Ortega y D. Juan Sainz Pérez, que me han guiado en todo momento con sus conocimientos, dedicación y capacidad de trabajo durante el desarrollo de este proyecto.

Al Departamento de Fisiología y a la Unidad Experimental del Hospital Virgen de las Nieves, y a todo el personal de los mismos, que ha colaborado en la elaboración de esta tesis, especialmente a D<sup>a</sup> Rosario Arcas y D<sup>a</sup> Magdalena Quintana por el trabajo técnico realizado.

A D. Pablo Bueno por su asesoramiento en la realización de algunas técnicas de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda desinteresada y su apoyo demostrado en todo momento: Isabel Rodríguez-Gómez, Rosemary Wangenstein y Miriam Álvarez-Guerra.

A toda mi familia que siempre ha estado ahí, y como no, a mis padres, por haberme animado a embarcarme en este trabajo.



## **Abreviaturas**

ACh: Acetilcolina

AMPc: Adenosín monofasfato cíclico

Ang II: Angiotensina II

ATP: Adenosín trifosfato

BH<sub>4</sub>: Tetrahidrobiopterina

Ca: Ión calcio

CAT: Catalasa

COX: Ciclooxygenasa

DAG: Diacilglicerol

DOCA: Deoxicorticosterona acetato

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ET-1: Endotelina-1

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FC: Frecuencia cardiaca

FHDE: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

FMN: Flavín mononucleótido

FRDE: Factor relajante derivado del endotelio

FSR: Flujo sanguíneo renal

GMPc: Guanosín monofostato cíclico

GPX: Glutation peroxidasa

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
IP<sub>3</sub>: inositol 1-4-5 trifosfato  
K: Ión potasio  
L-NAME: N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster  
L-NMMA: Nitro-monometil-L-arginina  
MDA: Malondialdehído  
MTZ: Metimazol  
NADPH: Nicotín adenina dinucleótido fosfato  
NE: Norepinefrina  
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal  
NO: Óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintasa  
NOSc: Óxido nítrico sintasa constitutiva  
NPS: Nitroprusiato sódico  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido  
ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito  
PA: Presión arterial  
PAM: Presión arterial media  
PAS: Presión arterial sistólica  
PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>  
Phe: Fenilefrina  
PIP<sub>2</sub>: 4,5 fosfatidilinositol bifosfato  
PKC: Proteína Kinasa C  
PLC: Fosfolipasa C  
PV: Papaverina  
RPP: Presión de perfusión renal  
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas



SNC: Sistema nervioso central

SNS: Sistema nervioso simpático

SOD: Superóxido dismutasa

SRA: Sistema renina-angiotensina

T<sub>3</sub>: Triyodotironina

T<sub>4</sub>: Tiroxina

TEA: Tetraetilamonio

TFG: Tasa de filtrado glomerular

TxA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>

VC: Vasoconstrictor

VD: Vasodilatador



## ***ÍNDICE***



<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. PAPEL DE LOS MEDIADORES ENDOTELIALES EN LA REACTIVIDAD VASCULAR .....</b>	<b>3</b>
1.1. Óxido nítrico .....	3
1.1.1. Síntesis del óxido nítrico .....	4
1.1.2. Mecanismo de acción .....	5
1.1.3. Óxido nítrico sintasas .....	5
• Clasificación .....	6
• Localización .....	7
1.1.4. Acción del óxido nítrico en los vasos sanguíneos y bloqueo de la NOS .....	10
1.1.5. Acciones renales del óxido nítrico .....	12
1.2. Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio .....	13
1.2.1. Mecanismo de liberación del FHDE .....	14
1.2.2. Identidad .....	15
1.2.3. Contribución del FHDE a la vasodilatación endotelio-dependiente .....	16
1.2.4. Actividad citocromo P-450 y enfermedad cardiovascular..	19
<b>2. VARIABLES BIOLÓGICAS EN EL HIPO E HIPERTIROIDISMO .....</b>	<b>20</b>
2.1. Cambios hemodinámicos .....	20
2.2. Función renal .....	22
2.2.1. Flujo sanguíneo renal y tasa de filtración glomerular .....	24
2.2.2. Proteinuria .....	25
2.3. Hipertrofia cardiaca .....	25

<b>3. REACTIVIDAD VASCULAR EN EL HIPO E HIPERTIROIDISMO .</b>	<b>28</b>
3.1. Vasoconstrictores .....	28
3.2. Vasodilatadores .....	32
3.3. Papel de los vasodilatadores endoteliales .....	34
<b>4. ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN LAS ALTERACIONES TIROIDEAS .....</b>	<b>36</b>
<b>5. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR Y RENAL .....</b>	<b>39</b>
5.1. Estrés oxidativo y función vascular .....	40
5.2. Radical superóxido y función renal .....	43
5.2.1. Interacción O <sub>2</sub> /NO en la función renal .....	44
5.3. Estrés oxidativo en el hiper e hipotiroidismo .....	44
5.4. Efecto del Tempol en el estrés oxidativo y función cardiovascular .....	45
<b>II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>III. MATERIALES MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
1. Fármacos e instrumentos utilizados .....	59
1.1. Fármacos .....	59
1.2. Instrumentos .....	59
2. Métodos experimentales .....	60
2.1. Animales y distribución .....	60
2.2. Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía en rabo .....	61
2.3. Cateterización de la arteria femoral .....	62

2.4. Medida de la presión arterial y frecuencia cardiaca por registro directo .....	65
3. Protocolos experimentales .....	63
3.1. Experimento 1. Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipotiroideas .....	63
3.2. Experimento 2. Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipertiroideas .....	66
3.3. Experimento 3. Efecto de dosis crecientes de T <sub>4</sub> en las enzimas antioxidantes y el estado de estrés oxidativo en estos animales .....	68
3.4. Experimento 4. Efecto del antioxidante Tempol en las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo .....	69
3.5. Experimento 5. Efecto del Tempol en la respuesta renal a vasoconstrictores .....	70
4. Procedimientos analíticos .....	71
4.1. Homogeneizado .....	71
4.2. Determinaciones enzimáticas .....	71
4.2.1. Actividad superóxido dismutasa .....	71
4.2.2 Actividad catalasa .....	72
4.2.3 Actividad glutatión reductasa .....	73
4.2.4 Actividad glutatión peroxidasa .....	74
4.3. Determinación del malondialdehído .....	75
4.4. Determinación total de isoprostanos F <sub>2</sub> .....	76

4.5. Determinación de sodio, potasio, urea, creatinina y proteínas Plasmáticas .....	76
4.6. Determinación de proteínas en tejidos .....	76
5. Métodos estadísticos .....	76
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>79</b>
1. Resultados. Tablas .....	81
2. Descripción de resultados .....	93
2.1. Experimento 1. Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipotiroideas .....	93
2.1.1. Variables biológicas .....	93
2.1.2. Respuesta a vasoconstrictores .....	93
2.1.3. Respuesta a vasodilatadores .....	97
2.2. Experimento 2. Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipertiroideas .....	102
2.2.1. Variables biológicas .....	102
2.2.2. Respuesta a vasoconstrictores .....	102
2.2.3. Respuesta a vasodilatadores .....	104
2.3. Experimento 3. Efecto de dosis crecientes de T <sub>4</sub> en las enzimas antioxidantes y el estado de estrés oxidativo en estos animales .....	107
2.3.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca .....	107
2.3.2. Variables metabólicas .....	107
2.3.3. Variables morfológicas .....	108



2.3.4. Variables plasmáticas .....	109
2.3.5. Variables urinarias .....	109
2.3.6. Actividad de enzimas antioxidantes .....	110
• Actividad enzimática de la corteza renal .....	110
• Actividad enzimática de la médula .....	111
• Actividad enzimática del ventrículo izquierdo .....	112
• Actividad enzimática del ventrículo derecho .....	113
2.4. Experimento 4. Efecto del antioxidante Tempol en las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo .....	114
2.4.1. Presión arterial sistólica y presión arterial media .....	114
2.4.2. Frecuencia cardiaca .....	115
2.4.3. Variables metabólicas .....	115
2.4.4. Variables morfológicas .....	116
2.4.5. Variables plasmáticas .....	117
2.4.6. Variables urinarias .....	117
2.5. Experimento 5. Efecto del Tempol en la respuesta renal a vasoconstrictores .....	119
2.5.1. Respuesta a fenilefrina .....	119
2.5.2. Respuesta a angiotensina II .....	120
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>121</b>
1. Reactividad vascular en el hipotiroidismo .....	123
2. Reactividad vascular en el hipertiroidismo .....	128
3. Efectos del estado hipertiroideo y Tempol en el estrés oxidativo .....	132
4. Efecto de la administración <i>crónica</i> de Tempol en la reactividad vascular a VC en las ratas hipertiroideas .....	139

<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>143</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>147</b>

## **I. *INTRODUCCIÓN***



## **1. PAPEL DE LOS MEDIADORES ENDOTELIALES EN LA REACTIVIDAD VASCULAR**

El endotelio, desempeña un papel principal en el control del tono del músculo liso vascular, liberando diversas sustancias vasodilatadoras, tales como el óxido nítrico (NO) (Palmer y cols., 1989), el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (FHDE) y las prostaciclina (Cohen y Vanhoutte, 1995; Hecker, 2000; Campbell y Harder, 1999; Quilley y McGiff, 2000; Campbell y Harder, 2001). Además de estos factores relajantes, el endotelio vascular también libera factores contráctiles como endotelina-1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), otros agentes dependientes de la ciclooxigenasa (COX), tales como prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), y radicales libres, como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

### **1.1. Óxido Nítrico**

El óxido nítrico no solamente ha sido definido como agente vasodilatador que regula el tono vascular (Gardiner y cols., 1990) y la excreción renal de sodio (Romero y cols., 1992; Cowley y cols., 1995) y, por consiguiente, la presión arterial, sino que también se le han atribuido otras diversas funciones que incluyen la regulación de la contractilidad cardíaca, transmisión de señales entre neuronas, formación de memoria a corto plazo, eliminación de agentes patógenos como bacterias y parásitos, reducción de la agregación plaquetaria y aumento en la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, entre otras (Lowenstein, 1994; Moncada, 1993; Poss y cols., 1995; Furchgott, 1993)

Estas funciones son posibles merced a la habilidad del endotelio para detectar estímulos humorales y hemodinámicos y, en función de estos, producir una serie de respuestas con la finalidad de mantener la homeostasis vascular (Furchgott y Vanhoutte, 1989; Vanhoutte, 1988).

### ***1.1.1. Síntesis del Óxido Nítrico***

El NO es un radical libre no cargado con un electrón no apareado compuesto por un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno. Estas características lo hacen una molécula ideal ya que al no tener carga difunde libremente a través de la capa lipídica de las membranas biológicas, y al tener un electrón libre no apareado es una molécula altamente reactiva en los procesos biológicos. Posee una vida media corta (3 a 5 segundos), después de la cual se degrada a compuestos de desecho como nitritos y nitratos (Lowenstein, 1994).

El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) que catalizan la conversión de L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico (Andrew y Mayer, 1999; Cosentino y Lüscher, 1999). La NOS posee dos dominios catalíticos. 1) El dominio de actividad reductasa está ubicado en la mitad C-terminal de la enzima y presenta los sitios de unión para los cofactores NADPH, FAD y FMN. Las flavinas FAD y FMN están encargadas del traslado de electrones desde el cofactor NADPH al grupo hemo. 2) El dominio de actividad oxidasa está compuesto por un grupo hemo ubicado en la mitad N-terminal de la proteína, y determina la oxidación de la L-arginina. Ambos dominios se hallan separados por un sitio de unión para la calmodulina. De esta manera un terminal guanidino nitrogenado de la arginina incorpora 5 electrones oxidándose, reacción que es sustentada por la NADPH reducida y las flavinas FMN y FAD. La tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y

el tiol constituyen cofactores adicionales de la NOS (Heymes y cols., 1999; Cosentino y Lüscher, 1999; Cosentino y Lüscher, 1998; Li y cols., 2001; Vanhoutte, 1997; White, 1992). El flujo de electrones se establece desde la NADPH hasta el hierro del grupo hemo. La transferencia de electrones requiere la fijación de calmodulina a la NOS.

### **1.2.2. Mecanismo de acción**

Tanto el NO sintetizado en la célula endotelial como el generado a partir de un dador, se unen al grupo hemo de la guanilatociclasa soluble (GCs) (Ignarro y cols., 1986) causando un cambio conformacional en la enzima que la hace activa, con el consiguiente aumento de la concentración intracelular del 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Schmidt y cols., 1993; Ignarro y cols., 1984; Rapoport y cols., 1983). A su vez, este segundo mensajero intracelular, provoca la apertura de canales de K<sup>+</sup> hiperpolarizando la fibra muscular lisa y disminuyendo el contenido intracelular del ión calcio. Tanto el NO producido en la célula endotelial como el administrado a partir de un dador utilizan como mecanismo de acción en la célula diana la activación de la GCs. El NO también podría ejercer efecto directo sobre canales de K<sub>Ca</sub> de la célula muscular.

### **1.1.3. Óxido Nítrico Sintetas**

La combinación de la ACh con un receptor muscarínico de la membrana de la célula endotelial lleva, por un mecanismo indirecto, a la activación de la NOS. La NOS funciona como un dímero con los dominios mencionados, y entre ambos se encuentra el dominio de calmodulina, quien juega un papel de suma importancia en la estructura y función de la enzima.

Las NOS están parcialmente ancladas en las caveolas (Li y cols., 2001), que son invaginaciones de la membrana plasmática que intervienen en la ligadura y organización en un conjunto de moléculas de señalización. Aparte de las sintasas de NO se encuentran receptores de ET-1 y de bradiquinina, factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteína kinasa C (PKC), Proteínas G, etc. Las caveolas producen caveolina-1, inhibidor de la síntesis de NO, inhibición que es revertida por la calmodulina (Harrison, 1997).

La síntesis de NO es inhibida por análogos estructurales como la Nitro-monometil-L-arginina (L-NMMA), N $\omega$ -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) y nitro-L-arginina (L-NA) (Cosentino y Lüscher, 1999; Ishii y cols., 1990). Palmer y colaboradores (1988a) confirmaron el rol de la L-arginina como precursor del NO endógeno con el hallazgo de la L-NMMA. Este compuesto que previamente se había descrito como inhibidor de la generación de nitritos y nitratos en macrófagos activados impidió tanto la relajación dependiente del endotelio como la liberación del NO, y cuyo efecto es revertido al añadir concentraciones crecientes de L-arginina, concluyéndose que la sustancia L-NMMA actúa como un inhibidor competitivo sobre la óxido nítrico sintasa (Hibbs, 1987; Palmer y cols., 1988b; Rees y cols., 1989).

- **Clasificación**

Actualmente se han identificado, clonado, secuenciado y localizado tres enzimas distintas en diferentes cromosomas humanos: la forma endotelial (eNOS) en el cromosoma 7, la forma neuronal (nNOS) en el cromosoma 12 y la



forma inducible (iNOS) en el cromosoma 17 (Bredt y cols., 1991; Nakane y cols., 1993), distinguiéndose en dos grupos:

1. **Enzimas constitutivas (NO<sub>Sc</sub>).**- En este grupo de enzimas se incluyen la forma endotelial (eNOS) de 135 Kda y la forma neuronal (nNOS) de 160 Kda. Están siempre presentes y tienen una producción basal de óxido nítrico en picomoles por cortos periodos. Las enzimas constitutivas son sensibles a quelantes de calcio y a inhibidores de la calmodulina, y se bloquean por los análogos de la L-arginina.
2. **Enzimas inducibles (NO<sub>Si</sub>).**- En este grupo se incluye la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) de 130 Kda. Su producción es estimulada en macrófagos y fagocitos para desencadenar reacciones inmunológicas. Éstos liberan grandes cantidades de NO (nanogramos) de forma sostenida bajo estímulo fisiopatológico, para así eliminar bacterias, parásitos y otros agentes patógenos (Shulz, 1995). Sin embargo, las iNOS también pueden producirse en diferentes células como las del músculo liso vascular y miocitos cardiacos conduciendo a una acción cronotrópica e inotrópica negativa (Lowenstein, 1994). La expresión de las iNOS es inhibida por glucocorticoides (Shulz, 1995).

- **Localización**

La nNOS, aparte de su ubicación en el SNC, es particularmente abundante en el riñón: glomérulos, lecho vascular renal, y en la mayoría de los

segmentos tubulares (Kone y cols., 1997, Bachmann y cols., 1994), siendo la actividad NOS en la médula considerablemente superior que en la corteza (Quesada y cols., 2000; Zou y cols., 1997).

La eNOS se encuentra distribuida por la mayoría de las partes de la circulación arterial y venosa, aunque hay una considerable heterogeneidad en la manera en que el NO controla el tono de las distintas regiones circulatorias (Boegehold, 1998).

Las isoformas constitutivas son reguladas por el nivel de calcio intracelular. Ciertos agentes como la acetilcolina y bradicinina entre otros, interactúan con receptores de la superficie de células endoteliales lo que produce un cambio en la actividad de la fosfolipasa C (PLC). La estimulación de esta enzima desencadena la formación del 1,4,5 inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) a partir del 4,5 fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>). Estas moléculas actúan abriendo canales de calcio y permitiendo la liberación de calcio intracelular. El calcio se liga a la calmodulina y este complejo activa la cNOS (Shymal y Keshava, 1995) generando NO más citrulina (Ignarro, 1996).

Sin embargo existen otros mecanismos adicionales de regulación de la NOS. Por ejemplo, esta enzima es sensible a las variaciones de la disponibilidad del sustrato L-arginina y/o de cofactores como la NADPH. Probablemente, el NO producido contribuiría también a la inhibición de la actividad de la NOS por un mecanismo de retroalimentación negativa, uniéndose al grupo hemo de la NOS en forma reversible (Rogers y Ignarro, 1992). Por lo tanto la actividad enzimática de la NOS puede regularse por diversos factores, como son, la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, la disponibilidad de sustrato y los niveles del mismo neurotransmisor.

La forma inducible, se expresa en una amplia variedad de células, que incluyen las células endoteliales (Radomski y cols., 1990), células del músculo liso vascular (Busse y Mulsch, 1990; Fleming y cols., 1991), miocitos cardíacos (Schulz y cols., 1992) y células inmunes tales como los macrófagos y los neutrófilos (Hibbs y cols., 1988; McCall y cols., 1989).

Se demostró, tras una serie de experimentos, que no es necesario adicionar calcio para activar la acción de la calmodulina sobre la iNOS. La calmodulina es una subunidad de la iNOS enzimáticamente activa y se liga fuertemente en unión no covalente tan pronto es transducida a partir del RNAm sin requerir la elevación del calcio por encima de las concentraciones halladas en células en reposo (Cho, 1992). Esto permitió explicar la activación constante de esta isoforma una vez ha sido estimulada su transducción.

La hipoxia, los estrógenos y el ejercicio alteran la expresión de la NOS. Hormonas como la noradrenalina y la vasopresina, los autacoides como la bradiquinina y la histamina, y los mediadores derivados de las plaquetas como la serotonina y el ATP pueden activar la NOS.

La liberación de NO esta modulada por estímulos físicos y humorales. Rubany y colaboradores (1986), comprobaron que el principal factor responsable de la liberación del óxido nítrico por las células endoteliales es el roce producido por la sangre sobre esta capa de células.

En otros estudios (Buse y cols., 1994), se sugirió que en los vasos sanguíneos existe un factor físico que activa a los mecanorreceptores de la pared vascular, induciendo la síntesis de NO por las células endoteliales a partir de la eNOS. Demostraron además que el óxido nítrico liberado podía actuar de forma local en el músculo liso subyacente, con una vida media de pocos segundos en soluciones biológicas.

Estudios hechos in vivo confirmaron los datos anteriores, demostrando que la vasodilatación inducida por variaciones del flujo sanguíneo es endotelio-dependiente. Mostraron que el aumento o la generación de flujo pulsátil, estimulaba la generación de NO y de prostaciclina en el endotelio de arterias profundidas.

Por otro lado, entre los mecanismos químicos, se distinguen aquellas sustancias cuya acción vasodilatadora no es dependiente de la integridad endotelial, como, la adenosina y adenosina monofosfato (AMP), papaverina, isoproterenol, nitrovasodilatadores, como gliceriltrimitrato y nitroprusiato sódico, y prostaciclina (Furchgott y cols., 1981; De Mey y Vanhoutte, 1981) frente a aquellas otras sustancias que si necesitan de células endoteliales intactas para inducir una relajación, como adenosina trifosfato (ATP) y adenosina difosfato (ADP) (Furchgott y cols., 1981; De Mey y Vanhoutte, 1981), bradicinina, sustancia P, e ionóforo de calcio A23187 (Furchgott, 1983).

#### **1.1.4. Acción del NO en los vasos sanguíneos y bloqueo de la NOS**

La relajación dependiente del endotelio se ha observado en arterias aisladas (Furchgott y Zawadzki, 1980; Rees y cols., 1989), en arteriolas (Woolfson y Poston, 1990), en venas (Yang y cols., 1991), en vénulas (Ohyanagi y cols., 1992), en la microvasculatura (Persson y cols., 1990; Ralevic y cols., 1992) y en vasos linfáticos (Ohhashi y Takahashi, 1991).

El NO es el mayor contribuyente de la relajación endotelio-dependiente en arterias grandes aisladas, incluyendo las coronarias, sistémicas, mesentéricas, pulmonares y cerebrales. Su importancia in vivo se aprecia cuando al inhibir la NOS se produce vasoconstricción en casi todos los lechos vasculares, asociado a un aumento de la presión arterial sistémica tanto en

animales como humanos (Ignarro y cols., 1987; Moncada y cols., 1991; Pearson y Vanhoutte, 1993; Schini-Kerth y Vanhoutte, 1995).

El óxido nítrico regula el tono vascular basal en vasos de resistencia. En el caso de los humanos, como en otras especies, el L-NMMA en vasos de resistencia aislados aumenta el tono inducido por norepinefrina (NE) e inhibe la vasodilatación causada por acetilcolina (Woolfson y Poston, 1990). Estos efectos están acompañados, además, por una disminución en la liberación de NO (Amezcuca y cols., 1988; Amezcuca y cols., 1989). Por otra parte, el NO endógeno aumenta en las arteriolas en las que la fuerza hidráulica y el estrés de rozamiento son mayores (Griffith y cols., 1987).

Sin embargo, los inhibidores de la NOS no causan un incremento en el tono basal en preparaciones venosas de animales (Ekelund y Mellander, 1990; Martin y cols., 1992) o humanos (Yang y cols., 1991) o en el lecho vascular renal aislado (Vargas y cols., 1994), sugiriendo que la liberación basal de NO no regula el tono en reposo de muchas venas.

Estudios realizados en anillos aórticos de animales tratados con L-NMMA muestran una disminución en la liberación de NO, confirmando que la respuesta a L-NMMA in vivo es debida a una disminución en la síntesis de NO (Rees y cols., 1989). Los efectos hipertensivos sistémicos del L-NMMA son debidos probablemente a una inhibición permanente de la síntesis de NO en pequeñas arterias y arteriolas, ya que la infusión local de L-NMMA directamente dentro de los lechos arteriales aumenta la resistencia (Vallance y cols., 1989; Ekelund y Mellander, 1990). En humanos la infusión local intraarterial de L-NMMA en la arteria braquial causa una caída del 40% del flujo sanguíneo del antebrazo (Vallance y cols., 1989; Calver y cols., 1992).

Estos estudios implican que los vasos de resistencia in vivo están en un continuo estado de vasodilatación mediada por NO.

La capacidad vasodilatadora dependiente del endotelio está reducida en pacientes hipertensos. La inhibición de las NOS aumenta la presión arterial, pero se niega la relación entre la alteración genética de la NOS y la hipertensión (Bonnardeaux y cols., 1995). En ratas SHR la administración de inhibidores de la ciclooxigenasa con disminución de la producción de PGH<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>, restituye la capacidad vasodilatadora dependiente del endotelio, sugiriendo que la relajación alterada se debería en parte a la existencia concomitante de vasoconstrictores.

La inhibición de la NOS con L-NMMA induce una contracción dependiente de endotelio en arterias aisladas de muchas especies incluyendo la rata (Rees y cols., 1990), el conejo (Palmer y cols., 1987; Rees y cols., 1989), el perro (Katusic y cols., 1990) o el humano (Yang y cols., 1991), indicando que hay una continua liberación de NO en el endotelio. Esta liberación de NO puede verse modificada durante el desarrollo, ya que los inhibidores de la síntesis de NO (el L-NMMA) no afectan al tono vascular en animales neonatos pero sí lo hacen en animales adultos provocando vasoconstricción (Liu y cols., 1992).

#### **1.1.5. Acciones renales del óxido nítrico**

El NO generado dentro del riñón controla la tasa de filtración glomerular (TFG), el flujo sanguíneo renal (FSR) y medular total, la presión natriuresis, el transporte epitelial de sodio, y la producción de varios factores vasoactivos, como la renina (Kone y cols., 1997; Ito, 1995; Bachmann y cols., 1994).

En el riñón, la infusión de sustancias que inducen liberación de NO en los vasos renales, como la acetilcolina, incrementan el volumen de orina y la excreción de sodio (Majid y cols., 1993). Por el contrario, la infusión de inhibidores de la producción endógena de NO producen una disminución de diuresis y natriuresis (Lahera y cols., 1991). En estos estudios, el efecto diurético y natriurético del NO no estuvo acompañado por cambios proporcionales en la TFG y en el FSR, indicando que el NO regula el transporte de sodio en la nefrona.

## **1.2. Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio**

El FHDE es una sustancia difusible, aún no identificada químicamente, pero se sabe que actúa hiperpolarizando el músculo liso vascular, produciendo vasorrelajación vía apertura de canales de potasio (Brayden y cols., 1991; Vanhoutte, 1993).

Estas relajaciones e hiperpolarizaciones dependientes del endotelio pueden ser parcial o totalmente alteradas por inhibidores de la NOS y de la COX.

El FHDE no es liberado continuamente (Nagao y Vanhoutte, 1991; Chen y cols., 1988; Chen y Suzuki, 1989). Esta liberación puede ser iniciada por acetilcolina, bradiquinina, nucleótidos de adenina, histamina, trombina, y sustancia P (Beny y Brunet, 1988; Feletou y Vanhoutte, 1988; Chen y cols., 1988; Chen y Suzuki, 1989; Beny, 1990; Beny y cols., 1986). En el caso de la bradiquinina, la hiperpolarización dependiente del endotelio está potenciada por inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (Mombouli, 1992).

La liberación del FHDE es un fenómeno  $Ca^{2+}$  dependiente, y puede ser activado por un ionóforo de  $Ca^{2+}$  A23187 (Chen y Suzuki, 1990; Nagao y

Vanhoutte, 1992). Probablemente es un proceso calmodulina-dependiente, ya que es prevenido por algunos inhibidores de calmodulina (Nagao y cols., 1992). El incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células endoteliales abre canales de  $K^+$  de conductancia baja e intermedia activados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) (Cai y cols., 1998; Burnham y cols., 2002), lo que a su vez origina un flujo de salida y acumulación de  $K^+$  en el espacio mioendotelial, hiperpolarizando y relajando, pero también conduce a la activación de diversas enzimas incluyendo fosfolipasas y el consecuente metabolismo del ácido araquidónico por citocromo P-450 epoxigenasas (Feletou y Vanhoutte, 1999; Busse cols., 2002).

Esta hiperpolarización y relajación dependiente del endotelio del músculo liso vascular es bloqueada por la depolarización del músculo liso con alto potasio extracelular o inhibidores de canales  $K_{Ca}$  tales como tetraetilamonio (Adeagbo y Triggle, 1993), apamina, caribdotoxina, y en algunos casos iberiotoxina.

### **1.2.1. Mecanismo de la liberación del factor hiperpolarizante dependiente del endotelio**

La bradiquinina relaja las arterias coronarias e hiperpolariza el músculo liso en presencia de L-nitroarginina e indometacina (Tomioka y cols., 2001). Sin embargo la presencia de níquel, inhibidor de la entrada de  $Ca^{2+}$  en las células endoteliales a través de los canales no selectivos de cationes, bloquea la respuesta a bradiquinina. Las células endoteliales contienen un canal calcio-permeable que es inhibido por la proteína quinasa G (Dora y cols., 2001). La bradiquinina y el KT5823, un inhibidor de la proteína quinasa G, incrementa el calcio intracelular en las células endoteliales (Tomioka y cols., 2001; Dora y cols., 2001). KT5823 también relaja e hiperpolariza el músculo liso. Estos datos



sugieren que la entrada de calcio a través del canal no selectivo de níquel-sensible está implicada en la liberación del FHDE. El mecanismo de activación del canal de cationes por agonistas es desconocido.

### 1.2.2. Identidad

La identidad del FHDE es todavía controvertida, probablemente porque existe más de un tipo. Hay autores que relacionan a los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), formados a partir del ácido araquidónico por la acción del citocromo P-450, con el FHDE. Otros lo achacan al ión potasio, peróxido de hidrógeno y fosfolipasa A<sub>2</sub>.

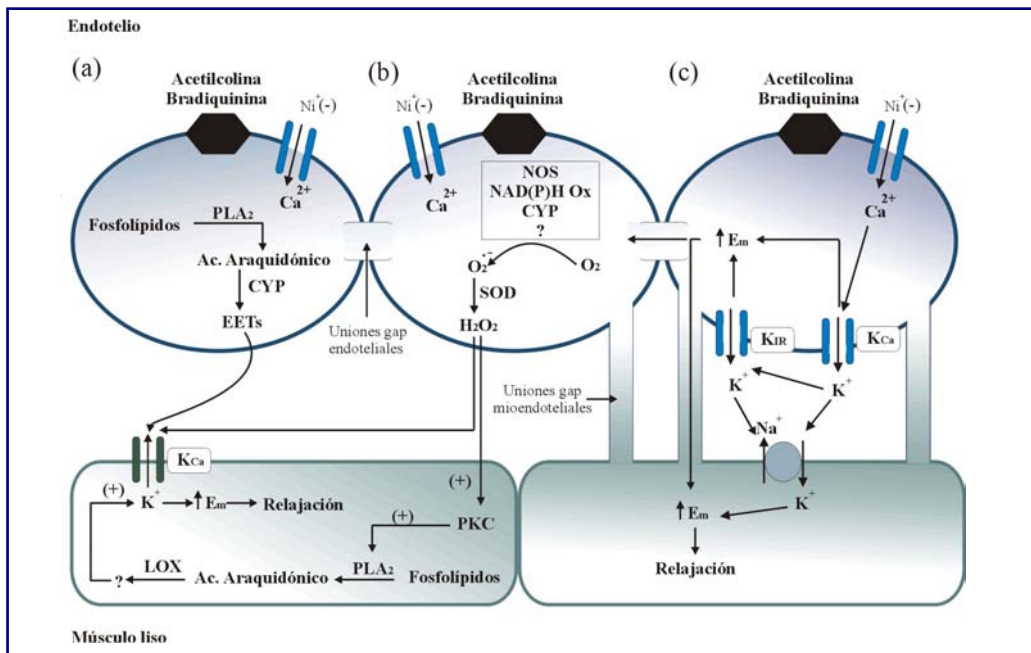


Fig. 1. Mecanismos propuestos de hiperpolarización y relajación por (a) EETs, (b) peróxido de hidrógeno o (c) ión potasio.

### **1.2.3. Contribución del FHDE a la vasodilatación endotelio-dependiente**

Estudios fisiológicos realizados en varias arterias, incluyendo las coronarias de humanos, han demostrado que la acetilcolina y otros dilatadores endotelio-dependientes causan hiperpolarización y relajación que es debida al FHDE, y diferente del NO y la prostaciclina (Cosentino y Lüscher, 1998; Li y cols., 2001; Vanhoutte, 1997; Harrison, 1997; Nagao y Vanhoutte, 1991; Brayden, 1990; Chen y Suzuki, 1989; Nagao y Vanhoutte, 1992).

Las enzimas citocromo P-450 son inhibidas por el NO, un fenómeno que podría explicar porqué las respuestas mediadas por el FHDE son difícilmente detectables en ausencia de un bloqueo combinado de las enzimas NOS y COX, y que ha llevado a sugerir que la vía EET/FHDE puede ser de menor importancia en vasos sanguíneos sanos, pero actuaría como mecanismo vasodilatador de reserva en circunstancias asociadas con una disfunción endotelial manifiesta en la que la disponibilidad de NO está alterada (Fleming, 2001).

La contribución del FHDE en la hiperpolarización y vasodilatación endotelio-dependiente varía en función del lecho vascular, especie y tamaño de las arterias siendo predominante en los vasos de resistencia (Harrison, 1997; Paulus y cols., 2001) frente al papel mayoritario que el NO juega en las arterias de conducción (Campbell y Gauthier, 2002; Garland y cols., 1995), excepto en los lechos vasculares coronario y renal donde el FHDE juega un papel primordial incluso en las arterias de conducción (Feletou y Vanhoutte, 1999; Bussey cols., 2002; Prieto y cols., 1998).

El hecho de que el FHDE sea tan relevante fisiológicamente en los vasos de resistencia ha sido puesto de manifiesto al demostrarse que ni la

interrupción del gen que codifica la enzima eNOS ni el bloqueo de esta enzima atenúan la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por agonistas tanto *in vitro* como *in vivo* (Brandes y cols., 2000).

El NO es responsable de hasta un 50% del efecto vasodilatador inducido por la ACh en la vasculatura renal de riñón aislado y perfundido tratado con indometacina, siendo el resto del efecto vasodilatador debido a la actividad del FHDE (Vargas y cols., 1994).

También se ha observado en presencia de indometacina que la L-nitroarginina suprime la relajación a ACh en aorta y arterias iliaca y pulmonar, mientras que un 80% de la relajación máxima permanece en arterias mesentéricas, y femoral.

El endotelio de arterias coronarias caninas perfundidas, cuando se activa con una tensión de roce o por acetilcolina, libera un factor que es distinto del NO y cuya activación puede ser prevenida con ouabaina (Hoefner y cols., 1989). Igualmente células endoteliales cultivadas de porcino en respuesta a fuerzas de cizallamiento y a ADP liberan no solo NO, sino también, una sustancia transferible que relaja el músculo liso vascular en un comportamiento ouabaina-sensible, que es el FHDE.

En el músculo liso vascular de cerebro, la glibenclamida bloquea la repolarización e hiperpolarización dependiente del endotelio estimulada por acetilcolina, mientras que en la arteria basilar este agente tiene un pequeño efecto en la relajación del músculo liso (Plane y Garland, 1993; Chen y Suzuki, 1990).

La vasodilatación inducida por acetilcolina en el lecho mesentérico de rata aislado y perfundido, el cual parece ser mediado predominantemente por el FHDE, es suprimido por apamina, sugiriendo que el FHDE puede actuar a

través de pequeños canales de conductancias  $K_{Ca}$  en este lecho vascular (Adeagbo y Triggle, 1993).

La infusión de L-NAME en el riñón aislado y perfundido de rata, incrementa la presión por perfusión basal (contracción del músculo liso), pero solo en una solución de alta concentración de  $K^+$  donde la acción del FHDE habría de ser bloqueada (Vargas y cols., 1994).

Los estrógenos son un protector contra enfermedades vasculares e incrementan la producción endotelial de NO y prostaglandina  $I_2$ . Nuevos datos sugieren que los estrógenos también modulan el FHDE. Se ha observado en arteria mesentérica de ratas, que la relajación inducida por acetilcolina es mayor en hembras que en machos (White y cols., 2000). Sin embargo cuando se realiza una ovariectomía la relajación e hiperpolarización disminuye, y con un tratamiento con estrógenos la respuesta se restituye (Liu y cols., 2001). Esto sugiere que los estrógenos son los responsables de las diferencias de respuesta entre género. Nuestro grupo observó en estudios anteriores, que la castración de ratas macho suprimió el dimorfismo sexual en el desarrollo de la hipertensión por inhibición de la síntesis de NO, disminuyendo la presión sistólica hasta el nivel de las hembras intactas y que la ovariectomía no afectó a la presión arterial (Sainz y cols., 2004). Esto indicaría que no son los estrógenos los que protegen a las hembras sino, más bien, la ausencia de testosterona. También se ha observado que la relajación inducida por flujo en arteriolas gracilis es mayor en ratas hembras que en machos (Wu y cols., 2001). Esta dilatación es completamente bloqueada por L-nitroarginina e indometacina en machos pero parcialmente inhibida en hembras, suprimiéndose esta respuesta residual con miconazol. Sin embargo, a la inversa ocurre en arterias cerebrales de ratas, donde la dilatación mediada por

el FHDE inducida por adenosín trifosfato es atenuada en ratas hembras (Holding y Kepler, 2001). Wangensteen y colaboradores (2004), mostraron que la atenuada respuesta a vasoconstrictores en los riñones de ratas hembra, está relacionada a un incremento de la producción de NO y FHDE y que la contribución de estos factores endotelio-dependientes, NO y FHDE, en la vasculatura renal son similares en machos y hembras.

#### **1.2.4. Actividad citocromo P-450 y enfermedad cardiovascular**

La relevancia funcional de las enzimas citocromo P-450 vasculares ha sido puesta de manifiesto en los últimos 15 años, por lo que su significación fisiopatológica no está completamente clarificada. Sin embargo, diversos estudios experimentales han indicado variaciones en esta actividad enzimática asociadas a ciertas enfermedades cardiovasculares. Dado que el NO inactiva las enzimas citocromo P-450 por su unión al grupo hemo y que las respuestas relajantes del FHDE se ponen de manifiesto al bloquear la NOS, cabría esperar que las disfunciones endoteliales que cursan con un descenso en la biodisponibilidad de NO estuvieran asociadas con un incremento en la actividad citocromo P-450 así como en las respuestas mediadas por el FHDE (Fleming, 2001). Confirmando esta hipótesis, se ha descrito una desviación de las respuestas relajantes derivadas del endotelio mediadas por NO hacia las mediadas por FHDE en los microvasos de hamsters con cardiomiopatía (Clark y Fuchs, 2000) y en arterias coronarias de ratas con insuficiencia cardiaca congestiva (Malmsjö y cols., 1999), así como también en los cambios inducidos por la bradicinina en el flujo sanguíneo del antebrazo en pacientes con hipertensión esencial (Taddei y cols., 1999). Nuestro grupo mostró (Vargas y cols., 1996), que los cambios observados en la reactividad vascular en las ratas

hipertensas inducidas por L-NAME, pueden jugar un papel importante en la patogénesis de este tipo de hipertensión. Además, se ha sugerido, que la inhibición del NO a largo plazo puede estar asociado con un aumento de la actividad del FHDE. Como lo indican otros resultados que sugieren que la expresión de la epoxigenasa citocromo P-450 y la génesis de EETs están incrementadas en la hipertensión (Pomposiello y cols., 2001) y en la hipercolesterolemia (Pfister y cols., 1991).

## **2. VARIABLES BIOLÓGICAS EN EL HIPO E HIPERTIROIDISMO**

### **2.1. Cambios hemodinámicos**

Las alteraciones tiroideas están acompañadas por cambios importantes en la hemodinámica y la función cardiaca (Klein y Ojamaa, 2001; Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998). Se producen alteraciones en la regulación de la presión arterial sistémica en ambos estados hipo e hipertiroides en humanos y animales (Klein y Ojamaa, 2001; Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998). Los cambios fisiopatológicos del hipertiroidismo se asume que son opuestos a aquellos que ocurren en el hipotiroidismo.

El hipertiroidismo produce una circulación hiperdinámica con incremento del gasto cardiaco, frecuencia cardiaca y disminución de las resistencias periféricas, mientras el hipotiroidismo crónico tiene un bajo gasto cardiaco, bradicardia y aumento de las resistencias periféricas (Klein y Ojamaa, 2001; Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998).

Además, el hipertiroidismo acelera (Vargas y cols., 1988), mientras el hipotiroidismo previene y revierte algunos modelos experimentales de hipertensión (Vargas y cols., 1988; Andrade y cols., 1992).

El hipertiroidismo está asociado con un aumento del volumen sanguíneo, y a la inversa ocurre con el hipotiroidismo (Graettinger y cols., 1957; Anthonisen y cols., 1960). La eritropoyesis y los niveles de eritropoyetina en suero varían directamente con los cambios en los niveles de T<sub>4</sub> en suero.

Una de las respuestas cardiovasculares más tempranas a la administración de la hormona tiroidea es una disminución de la resistencia vascular periférica (Klein y Ojamaa, 2001; Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998). Esto ha sido observado en pacientes hipotiroideos así como en animales eutiroideos después de la administración aguda de la hormona tiroidea. El hipertiroidismo puede estar asociado con un 50% de caída en la resistencia vascular sistémica (RVS) (Anthonisen y cols., 1960; Graettinger y cols., 1959). Una resistencia vascular reducida podría considerarse por un aumento de la vasculatura y/o alteraciones en el mecanismo del control vascular favoreciendo una mayor vasodilatación. Se ha visto que el hipertiroidismo está asociado con un mayor número de capilares en los músculos de humanos (Celsing y cols., 1986) y ratas (Capo y Sillau, 1983). El aumento de la densidad capilar puede estar acompañado en paralelo por un aumento en el número de vasos arteriales de resistencia que podría reducir la resistencia vascular. La liberación local de vasodilatadores en tejidos periféricos asociados con el hipertiroidismo podría causar dilatación de los vasos de resistencia (Scivoletto y cols., 1986; Büssemaaker y cols., 2003). Una hipótesis alternativa involucra la habilidad de la hormona tiroidea de reducir directamente el tono arteriolar del músculo liso en vasos de conducción y de resistencia (Ishikawa y cols., 1989; Zwaveling y cols., 1997). También se ha observado en vasos sanguíneos periféricos de animales que el bloqueo de los receptores  $\beta$  invierte la bajada de la RVP mediada por la T<sub>3</sub> y anula el incremento del gasto cardiaco (Kapitola y

Vilimovská, 1981). Es más, que este aumento del flujo sanguíneo en el hipertiroidismo pueda ser abolido parcialmente por la atropina, hace pensar en una respuesta vasodilatadora mediada por catecolaminérgicos.

## **2.2. Función renal**

Es bien conocido que el hipotiroidismo disminuye y el hipertiroidismo aumenta el peso del riñón relativo al peso corporal. Este mecanismo no está completamente claro, pero parece que participa el sistema renina-angiotensina. Así, Kobori y colaboradores (1998), observaron que el losartán causó una regresión de la hipertrofia renal inducida por la tiroxina. Sin embargo, otros autores encontraron que la administración crónica de captopril (García del Río y cols., 1997) o losartán (Rodríguez-Gómez y cols., 2003) no modificaron significativamente la hipertrofia renal en ratas hipertiroideas.

Las alteraciones tiroideas tienen importantes efectos en la función renal y en el metabolismo hidrosalino (Bradley y cols., 1974; Emmanuel y cols., 1974; Michael y cols., 1972). El hipotiroidismo inducido por tiroidectomía o medios químicos genera un aumento de diuresis y natriuresis en condiciones basales (Bradley y cols., 1974; Emmanuel y cols., 1974; Michael y cols., 1972), después de una expansión salina (Holmes y DiScala, 1970; Taylor y Fregly, 1964) o en condiciones de restricción de sodio (Taylor y Fregly, 1964). Esta natriuresis sugiere que puede ser un mecanismo por el cual el hipotiroidismo previene la hipertensión arterial experimental (Bradley y cols., 1974). Sin embargo, otros autores fueron incapaces de detectar un aumento en la excreción de sodio en ratas hipotiroideas tratadas con metimazol en las mismas condiciones descritas anteriormente (Vargas y cols., 1991). Además, la excreción normal de sodio y agua en ratas hipotiroideas en un estudio de presión-diuresis-natriuresis



(Vargas y cols., 1994), demuestra que el hipotiroidismo inducido por metimazol no puede ser considerado un síndrome de pierde sal. Estos resultados también indican que la hipotensión arterial inducida por el estado hipotiroideo no está acompañada por un desplazamiento a la izquierda de la curva presión-diuresis-natriuresis, como predice la teoría de Guyton sobre la regulación de la presión arterial. La diferencia de los resultados de nuestro grupo con otros autores puede ser debida a los diferentes protocolos usados, como, cambios en la duración del hipotiroidismo, uso del anestésico (Michael y cols., 1972) y el uso de expansiones con el mismo volumen que en las ratas control (Stephan y cols., 1964), sin tener en cuenta el reducido peso corporal de las ratas hipotiroideas. Por otro lado, otros autores tampoco encontraron una elevación en la diuresis o natriuresis (Emmanuel y cols., 1974; Katz y Lindheimer, 1973) en ratas hipotiroideas.

También se ha observado en ratas hipotiroideas una reducción en la capacidad de concentrar la orina (Michael y cols., 1972.; Holmes y DiScala, 1970). Sin embargo, nuestro grupo observó que, la capacidad de concentración, no disminuyó en ratas tratadas con metimazol (Vargas y cols., 1991); mientras, que las ratas hipertiroideas mostraron un incremento en la capacidad de concentrar la orina después de la privación de agua (Vargas y cols., 1991).

Mientras en el hipotiroidismo se han estudiado extensamente los efectos en la función renal, en el hipertiroidismo hay menos datos acerca de su efecto, donde se ha visto una tendencia hacia la retención de sodio. Así, la excreción absoluta y fraccional de sodio disminuyó en ratas hipertiroideas en condiciones normales (Katz y Lindheimer, 1973), observándose también una reducida natriuresis después de cargas salinas isotónicas e hipertónicas (Vargas y cols., 1991). Además, las ratas hipertensas hipertiroideas también

muestran un desplazamiento en la respuesta presión-diuresis-natriuresis hacia presiones más altas (Vargas y cols., 1994). Este desplazamiento es debido a una disminución en la carga filtrada de sodio y a un aumento en la reabsorción tubular de sodio. La consecuencia de estos cambios en la relación presión-natriuresis es que la presión de perfusión renal tendría que ser elevada en ratas hipertiroideas para lograr la misma excreción de sodio que las controles. Estas observaciones coinciden con los resultados en otros modelos experimentales de hipertensión (Guyton, 1980).

### **2.2.1. El flujo sanguíneo renal y tasa de filtración glomerular**

Tanto para el flujo sanguíneo renal (FSR) como para la tasa de filtración glomerular (TFG) se han observado resultados contradictorios tanto en pacientes hipertiroideos (Cutler y cols., 1967; Ford y cols., 1961), como en el hipotiroidismo humano y de ratas (Emmanuel y cols., 1976; Michael y cols., 1972; Taylor y Fregly, 1964). Estas diferencias pueden ser debidas a que tanto el FSR como la TFG, en algunos estudios, no estaban relacionados con el peso del riñón, especialmente en ratas hiper e hipotiroideas que tienen mayor y menor tamaño renal, respectivamente, que las ratas controles. En este sentido, Fregly y colaboradores (1962), mostraron que cuando se relacionaban FSR y TFG al tamaño del riñón, las ratio eran las mismas que los controles. Varias observaciones de nuestro grupo indican que el aclaramiento de creatinina, en ratas conscientes, relacionado con el peso del riñón, disminuye con la administración de tiroxina de forma relativa al tiempo de inducción del hipertiroidismo y de la dosis de T<sub>4</sub> empleada (Rodríguez-Gomez y cols., 2003; Vargas y cols., 1994; Garcia-Estañ y cols., 1995; Rodríguez-Gómez y cols., 2005).

### **2.2.2. Proteinuria**

Se ha mostrado en varios trabajos que las ratas hipertiroideas promueven una proteinuria incrementada, en consonancia con la presencia de proteinuria descrita en los pacientes con la enfermedad de Grave (Weetman y cols., 1985). Esta alteración no está relacionada con la presión arterial, ya que una terapia antihipertensiva no es capaz de reducir la proteinuria (Rodríguez-Gomez y cols., 2003). La proteinuria parece también no estar relacionada con la actividad del sistema renina-angiotensina (Rodríguez-Gomez y cols., 2003). Estas observaciones sugieren que la proteinuria en el estado hipertiroideo puede estar producida por una acción directa de las hormonas tiroideas, aumentando la permeabilidad de la barrera glomerular. En este contexto, Tanwani y colaboradores (2002), aportaron datos de una posible asociación entre los pacientes tirotóxicos y un síndrome nefrótico atribuible a una nefropatía de cambios mínimos, una entidad clínica definida por una proteinuria que ocurre en ausencia de lesión en la pared capilar glomerular.

### **2.3. Hipertrofia cardiaca**

El estado hipertiroideo se asocia a una hipertrofia cardiaca (Klein y Ojamaa, 1995; García del Río y cols., 1997; Rodríguez-Gomez y cols., 2003; Klein I, 1998). La hormona tiroidea podría promover el desarrollo de una hipertrofia cardiaca, bien por un efecto directo en la síntesis de la proteína de miocardio, y/o indirectamente a través de cambios en el gasto cardiaco (Klein I, 1998; Klein y Hong, 1986). El hipertiroidismo aumenta el gasto cardíaco y la frecuencia cardiaca basal, y estudios realizados en cultivos de células sugieren

que los efectos de la  $T_4$  en el corazón están mediados por efectos directos de la  $T_4$  en el metabolismo proteico (Sanford y cols., 1978).

El hipertiroidismo produce hipertensión arterial y un incremento de la tasa peso del corazón/peso corporal, una medida de la hipertrofia ventricular relativa. Además, el tratamiento con  $T_4$ , no afecta o reduce la tasa peso VI/VD (Rodríguez-Gómez y cols., 2005; Gerdes y cols., 1985). Por consiguiente, ambos pesos ventriculares, aumentaron con el tratamiento tiroideo en animales, pero la masa ventricular derecha aumentó más que la masa ventricular izquierda. Esta observación contrasta con el aumento de la tasa VI/VD normalmente observada en otros tipos de hipertensión, y puede ser debida a que el hipertiroidismo produce una circulación hiperdinámica, un tipo de hipertrofia cardiaca secundaria a sobrecarga de volumen (Klein y Ojamaa, 1995).

Se ha observado que cuando el propranolol se administra simultáneamente con  $T_4$ , ambas respuestas, frecuencia cardiaca e hipertrofia, se previenen (Klein, 1988). Sin embargo, Gerdes y colaboradores (1987), mostraron que el propranolol modifica las dimensiones del miocito en ratas eutiroideas e hipertiroides, pero no previene la hipertrofia cardiaca inducida por la hormona tiroidea, y este grupo (Gerdes y cols., 1985) también mostró que el propranolol no previene la hipertrofia cardiaca y necrosis celular multifocal en la rata con hipertiroidismo crónico.

Uno de los factores que contribuyen directamente, o junto con la elevada presión arterial, al desarrollo de hipertrofia cardiaca es el sistema renina angiotensina (SRA) (Dahlöf, 1988; Morgan y Baker, 1991). La hormona tiroidea induce hipertrofia cardiaca junto con aumentos en la expresión cardiaca del mRNA de renina, renina cardiaca y angiotensina II cardiaca (Kobori y cols., 1997; Kobori y cols., 1999). Estos autores, sugirieron que el sistema renina-

angiotensina local juega un papel primario en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por el hipertiroidismo, y este mismo grupo (Kobori y cols., 1997) observó que la administración de inhibidores del SRA suprimió el SRA cardiaco, sugiriendo que contribuye al retroceso de la hipertrofia cardiaca en el estado hipertiroidico. Después, Basset y colaboradores (2001) también observaron que el tratamiento crónico con valsartán, un antagonista del receptor del tipo 1 de la angiotensina II, previno el desarrollo de la hipertrofia del ventrículo izquierdo asociado con tirotoxicosis. Y Asahi y colaboradores (2001), observaron que el cilazapril y propranolol disminuyeron la presión arterial en la misma magnitud en ratas hipertiroidicas, pero sólo el cilazapril redujo la hipertrofia cardiaca. Sin embargo, el bloqueo crónico de la enzima convertidora de angiotensina (García del Río y cols., 1997) o AT<sub>1</sub> (Rodríguez-Gomez y cols., 2003) no altera significativamente la hipertrofia ventricular relativa tanto en ratas normotensas (Bedotto y cols., 1989) como en hipertensas (García del Río y cols., 1997; Rodríguez-Gomez y cols., 2003) hipertiroidicas, indicando que el SRA circulante no juega un papel esencial en este tipo de hipertrofia cardiaca.

Otras observaciones indican que la hipertrofia ventricular en el hipertiroidismo no está relacionada con la presión arterial. Así, aumentos en la presión arterial inducidos por L-NAME (Klein y Ojamaa, 1995) o reducciones producidas por losartán (Rodríguez-Gomez y cols., 2003) en ratas hipertiroidicas no modifican la hipertrofia ventricular. Estos datos indican que la hipertrofia cardiaca en el hipertiroidismo no está relacionada con la presión arterial. En este sentido, Bedotto y colaboradores (1989), también observaron que la hipertrofia cardiaca producida por la hormona tiroidea es independiente de la sobrecarga cardiaca. Podría proponerse que un efecto

trófico directo de las hormonas tiroideas en el corazón puede ser el responsable de la hipertrofia cardiaca en el hipertiroidismo. En apoyo a esta propuesta, estudios realizados en cardiomiocitos cultivados han demostrado que la hormona tiroidea controla directamente la expresión génica y factores de crecimiento (Morgan y Baker, 1991).

Grupos	Hipertiroidismo	Hipotiroidismo
<i>Variables morfológicas</i>		
Peso Corporal	↓	↓
Peso Tiroideo	↓	↑
Peso ventricular	↑	↓
Peso Renal	↑	↓
Peso ventricular/peso corporal	↑	↓
Peso renal/peso corporal	↑	↓
Ventrículo izquierdo/ventrículo derecho	↑	No medido
<i>Variables Hemodinámicas</i>		
Presión arterial	↑	↓
Volumen sanguíneo	↑	↓
Gasto cardiaco	↑	↓
Resistencia periférica total	↓	↑
Frecuencia cardiaca	↑	↓
Presión de pulso	↑	↓

Fig. 2. Variables morfológicas y hemodinámicas en el hipo e hipertiroidismo experimental.

### 3. REACTIVIDAD VASCULAR EN EL HIPO E HIPERTIROIDISMO

#### 3.1. Vasoconstrictores

Se han encontrado alteraciones en la respuesta vascular a vasoconstrictores en animales hipo e hipertiroides. Sin embargo, no existe consenso sobre la respuesta a vasoconstrictores en el hipo e hipertiroidismo. Distintos autores, utilizando diferentes preparaciones del músculo liso

vascular han encontrado que la respuesta a vasoconstrictores puede estar reducida, sin cambios o aumentar en ambas alteraciones tiroideas. Estas discrepancias pueden ser debidas al uso de diferentes protocolos, produciéndose cambios en factores tan importantes como la preparación vascular, duración de la enfermedad, el uso de anestesia, el análisis estadístico usado (Koehn y cols., 1967), la presencia de cambios en la presión arterial, y la magnitud o duración de estos cambios. Además, algunos de estos estudios fueron realizados antes de que se conociera que la presencia y ausencia del endotelio podía modificar la acción de los agonistas contráctiles (Vanhoutte, 1989), por lo que el endotelio pudo haber sido dañado en los primeros estudios.

Ratas hipotiroideas enteras mostraron una reducida respuesta a norepinefrina (NE) y una respuesta normal a Ang II (Vargas y cols., 1991). Sin embargo, en preparaciones de cuartos traseros de ratas hipotiroideas la reactividad vascular a Ang II mostró un aumento o respuesta normal dependiendo del análisis estadístico usado (Koehn y cols., 1967).

En varias preparaciones de animales hipotiroideos se ha encontrado una respuesta vascular disminuida a Phe y a otros agonistas  $\alpha_1$ -adrenorreceptores (Brown y Pollock, 1980; Grieve y cols., 1999; Rahmani y cols., 1987; Sabio y cols., 1994), aunque, también se ha encontrado una respuesta normal en la vasculatura mesentérica (Ishac y cols., 1983; Takiguchi y cols., 1988). El efecto inhibitorio del hipotiroidismo sobre la contracción inducida por Phe fue restaurado por una terapia sustitutiva con tiroxina (Grieve y cols., 1999), sugiriendo que la acción de las drogas antitiroideas es dependiente de la inducción del estado hipotiroideo y no es debido a una acción directa de las drogas o a otros factores no relacionados.

Esta disminuida sensibilidad a Phe mostrada en órganos aislados de animales hipotiroideos puede explicarse por una reducción en el número de  $\alpha_1$ -adrenorreceptores presentes en el músculo liso vascular o por un cambio en su eficacia de acoplamiento. Sin embargo, aunque se ha establecido que el hipotiroidismo puede modular el número de  $\alpha$ -adrenorreceptores presentes en el tejido cardíaco (Zwaveling y cols., 1996), no hay actualmente ninguna evidencia directa que sugiera que tenga un efecto similar en la densidad de los  $\alpha_1$ -adrenorreceptores vasculares. Además, el hipotiroidismo provoca una respuesta anómala del propio músculo liso vascular, como consecuencia de una deficiencia tiroidea crónica, como indica la reducción de la respuesta a cloruro de potasio o cloruro de bario en tiras aórticas o riñones aislados, respectivamente, obtenidos de ratas tratadas con metimazol (Sabio y cols., 1994; Vargas y cols., 1996). Además, la respuesta vasoconstrictora a ATP en riñones hipotiroideos también se encontró casi ausente (Vargas y cols., 1996).

En resumen, la mayoría de los resultados demuestran que el hipotiroidismo está acompañado de un marcado descenso en la sensibilidad a agentes  $\alpha$ -adrenérgicos, purinérgicos y estimulantes no específicos del músculo liso vascular en arterias de gran calibre y vasos de resistencia. Esta alteración en la respuesta a vasoconstrictores puede jugar un papel en la reducida presión arterial de ratas hipotiroideas, así como en los efectos preventivos del hipotiroidismo en la hipertensión experimental.

En el hipertiroidismo, también hay resultados discrepantes sobre la naturaleza de los cambios en la vasoconstricción. Nuestro grupo observó que la reactividad vascular a vasoconstrictores fue mayor en la vasculatura renal de ratas hipertiroideas que en controles, mientras que las tiras aórticas de esas ratas no presentaron más actividad que esos controles (Sabio y cols., 1994).



Los datos obtenidos por otros laboratorios en vasos de conducción (tiras aórticas o anillos) de ratas hipertiroideas mostraron una reactividad normal (Rahmani y cols., 1987), aumentada (Field y cols., 1973) y disminuida (Scivoletto y cols., 1986; Gunasekera y Kuriyama, 1990; McAllister y cols., 1998; Honda y cols., 2000) a diferentes vasoconstrictores. Se ha observado en el tejido aórtico de ratas hipertiroideas una disminución de  $\alpha_1$ -adrenorreceptores (Gunasekera y Kuriyama, 1990) y una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por  $\alpha_1$ -adrenorreceptores (Stratton y Morrow, 1991).

El incremento de la reactividad a vasoconstrictores en riñones aislados y perfundidos de ratas hipertiroideas contrasta con la respuesta normal descrita en el lecho vascular de cuartos traseros de perros y ratas (Koehn y cols., 1967; Zsoter y cols., 1964; Van der Schoot y Moran, 1965). En arterias mesentéricas de ratas hipertiroideas también se han observado respuestas discrepantes, aportándose aumentos en la respuesta (Grassby y McNeill, 1988) y una reactividad normal (Ishac y Pennefather, 1983; Zwaveling y cols., 1996) a agentes  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mientras que la contracción inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) aumentó (Grassby y McNeill, 1988). La respuesta contráctil en arterias coronarias también mostró resultados contradictorios; así, se ha observado un incremento de reactividad a 5-HT (Miyazawa y cols., 1989) y una respuesta normal a 5-HT, U46619 y metoxamina (Zwaveling y cols., 1997).

Estos datos indican que no hay una alteración generalizada en la respuesta a los agentes vasoconstrictores en las ratas hipertiroideas y que esta respuesta es tejido y tiempo dependiente. Estas diferencias entre las preparaciones pueden ser debidas a diferencias funcionales y reguladoras

inherentes entre grandes arterias de conducción y arteriolas en los diferentes tejidos.

### 3.2. Vasodilatadores

En ratas hipotiroideas, la sensibilidad renal a vasodilatadores endotelio-dependientes y a donantes de NO está significativamente reducida (Vargas y cols., 1995), hallazgo que contrasta con una respuesta normal en la aorta (Vargas y cols., 1995) y en ratas conscientes (Vargas y cols., 1994). Delp y colaboradores (1995), encontraron que el hipotiroidismo estaba asociado con una suprimida vasorrelajación endotelio-dependiente aórtica.

Takiguchi y colaboradores (1988), observaron que la vasodilatación endotelio-dependiente en la vasculatura mesentérica, dio resultados divergentes en función del agonista usado, como por ejemplo, una disminución de respuesta a histamina, una respuesta normal a ACh, pero no se observó ningún cambio significativo en la respuesta a papaverina (agonista endotelio-independiente). Las diferencias en la preparación usada pueden ser la principal causa de estas discrepancias, como sugieren los resultados aportados por nuestro grupo.

En aorta (Gunasekera y Kuriyama, 1990) y en el lecho vascular mesentérico (Takiguchi y cols., 1988) de ratas hipotiroideas, también se ha observado una disminución de respuesta a isoprenalina, de acuerdo con la disminución de receptores  $\beta$ -adrenérgicos observados en la vasculatura de estas ratas (Gunasekera y Kuriyama, 1990). Se ha sugerido que la reducida respuesta a vasodilatadores en la vasculatura renal de estos animales puede jugar un papel en el incremento de la resistencia vascular periférica (Vargas y cols., 1995).

En ratas hipertensas hipertiroideas los vasos de conducción (aorta aislada) y de resistencia (riñón aislado) mostraron un incremento en la respuesta a ACh (Vargas y cols., 1995). Este incremento en la respuesta endotelio-dependiente en preparaciones de ratas hipertiroideas fue confirmado posteriormente por otros laboratorios (Büssemaker y cols., 2003; McAllister y cols., 1998; Iwata y Honda, 2004). Aunque, Lockette y colaboradores (1987), observaron que en aorta de ratas hipertiroideas la relajación es menor a ACh; al ionóforo del calcio, A23187; y al nitroprusiato sódico (NPS) y que la sensibilidad al factor natriurético atrial y 8-Br cGMP estaba inalterada.

Honda y colaboradores (2000), observaron en anillos aórticos de rata que el tratamiento con T<sub>4</sub> durante 3 días aumentó significativamente la relajación inducida por ACh y NPS, e indicaron que el tratamiento con T<sub>4</sub> por un periodo mayor (1-2 semanas), no tuvo influencia significativa en la vasorrelajación inducida por ACh y NPS. El incremento de vasodilatación endotelio-dependiente, usualmente observado en vasos de resistencia de ratas hipertiroideas, concuerda con la reducida resistencia vascular característica de esta enfermedad y puede ser, en parte, debido al shear stress inducido por el incremento del gasto cardíaco en la pared vascular.

También se han observado resultados similares en otras enfermedades que cursan con una circulación hiperdinámica e incremento del gasto cardíaco con una disminución de la resistencia periférica, como la cirrosis hepática (García-Estañ y cols., 1994). Todos estos datos sugieren que un aumento en la respuesta a vasodilatadores endotelio-dependientes puede participar en una reducida resistencia vascular periférica observada en síndromes hiperdinámicos circulatorios, sin tener en cuenta el nivel de presión arterial sistémica. Por el contrario, el hipotiroidismo, con un reducido gasto cardíaco,

está asociado con una vasorrelajación endotelio-dependiente marcadamente reducida (Vargas y cols., 1995; Delp y cols., 1995) y una resistencia vascular aumentada (Larsen y cols., 1998; Klein, 1990). Además, las hormonas tiroideas pueden tener efectos directos en la expresión génica en la pared vascular explicando la vasorrelajación endotelio-dependiente aumentada.

### **3.3. Papel de los vasodilatadores endoteliales**

Como ya se ha comentado, el endotelio sirve como un sensor de presión y flujo, activando, ambos, la liberación de factores relajantes derivados del endotelio (Rubanyi y cols., 1990). Cuando se elimina el endotelio aumenta la sensibilidad a VC en el riñón aislado (Ercan y cols., 1990; Vargas y Osuna, 1996) y también aumenta la respuesta producida por la administración de L-NAME o TEA (Vargas y Osuna, 1996), indicando que el NO y el FHDE modulan la respuesta a VC en el riñón aislado perfundido. Por lo que una alteración en la liberación de los mediadores endoteliales juega un importante papel en la génesis de las anomalías vasculares funcionales que aparecen en la hipertensión, arteriosclerosis o diabetes.

Estudios realizados en células endoteliales cultivadas (Noris y cols., 1995; Ranjan y cols., 1995; Uematsu y cols., 1995) y en vasos sanguíneos (Nodaud y cols., 1996) expuestos a un aumento de shear stress y flujo, respectivamente, mostraron un aumento en la vasodilatación endotelio-dependiente e incremento en la actividad y/o la expresión de la NOS. Por consiguiente es posible que un aumento del gasto cardíaco en ratas hipertiroideas (Klein, 1990), produzca un incremento de la actividad NOS con un aumento crónico en la tensión de roce en la vasculatura endotelial. En consonancia con esta idea, el hipo e hipertiroidismo presentan una disminuida y aumentada respuesta

endotelial máxima, respectivamente (McAllister y cols., 1998; Vargas y cols., 1995).

Preparaciones de ratas hipotiroideas muestran una atenuada respuesta a VC y sobre todo al agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, Phe (Grieve y cols., 1999; Sabio y cols., 1994). Grieve y colaboradores (1999), sugirieron que un aumento en la producción de NO por el endotelio juega un papel en la hiporespuesta a Phe en ratas hipotiroideas. Sin embargo, nuestro grupo no encontró ninguna evidencia bioquímica (Quesada y cols., 2002) o funcional (Vargas y cols., 1995) de tales aumentos de la actividad NO en el hipotiroidismo.

Además, el hipotiroidismo puede prevenir la hipertensión inducida con una dosis elevada de un inhibidor de NO (Vargas y cols., 1996) donde el incremento de la sensibilidad presora a VC juega un papel esencial (Vargas y cols., 1996), sugiriendo que el hipotiroidismo puede reducir la respuesta a VC incluso en ausencia de NO.

En ratas hipertiroideas aumenta la respuesta a vasodilatadores endotelio-dependiente, acetilcolina, en vasos de resistencia (McAllister y cols., 1998; Vargas y cols., 1995). McAllister y colaboradores (1998), observaron que las respuestas contráctiles a NE estaban reducidas en el estado hipertiroideo en presencia de un endotelio intacto, mientras que los anillos vasculares de ratas hiper y eutiroideas sin endotelio no mostraban diferencias significativas en las respuestas contráctiles a NE. Estos resultados sugieren que las respuestas reducidas a NE en vasos con el endotelio intacto son principalmente debidas a adaptaciones endoteliales inducidas por el hipertiroidismo. Resultados similares fueron obtenidos por Scivoletto y colaboradores (1986) en anillos aórticos de rata. Más recientemente, Büssemaker y colaboradores (2003), determinaron los efectos del hipertiroidismo agudo y crónico in vivo en la

contribución del NO y FHDE en la relajación dependiente del endotelio en anillos de arteria renal, y observaron que esta relajación aumentó con el tratamiento con T<sub>3</sub>, entre las 36 h y 8 semanas. En este periodo de tiempo, la relajación mediada por el FHDE y por el NO aumentó significativamente. Después de las 8 semanas con este tratamiento, la relajación mediada por el FHDE disminuyó, mientras que la relajación mediada por el NO permaneció aumentada, observando que la expresión de la NO sintasa endotelial estaba notablemente aumentada. Además, estos autores también observaron en arterias renales de las ratas tratadas durante 8 semanas con T<sub>3</sub>, que las células del músculo liso estaban significativamente hiperpolarizadas respecto a los controles, fenómeno que puede ser también como consecuencia de una elevación crónica del shear stress, al ser este factor conocido por estimular la expresión de los canales de potasio en las células endoteliales (Hoger y cols., 2002).

#### **4. ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN LAS ALTERACIONES TIROIDEAS**

El hipotiroidismo inducido por propiltiouracilo (PTU) causa una disminución de la expresión génica de la NOS en el hipotálamo de rata, efecto que se invirtió con un suplemento dietético con tiroxina.

La actividad NOS en ratas hipertiroideas está aumentada en los tejidos relacionados con el control de la presión arterial (Quesada y cols., 2002). El mecanismo responsable del aumento de la actividad NOS en ratas hipertiroideas no se conoce, y son varios los factores propuestos que pueden participar: a) un efecto directo de las hormonas tiroideas; así, se ha observado en sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta después de la adición de T<sub>3</sub>,

una estimulación de la actividad NOS por una vía distinta a la genómica (entre los 10 y 30 s) (Chakrabarti y Ray, 2000); b) una respuesta compensatoria a la alta presión arterial de estos animales (Vaziri y cols., 1998); c) una liberación aumentada de sustancias vasoactivas como la Ang II (Hennington y cols., 1998) o endotelina (Hirata y cols., 1995), las cuales aumentan la producción de NO en ratas hipertiroideas (Marchant y cols., 1993; Singh y cols., 1994); d) o al mecanismo de tensión de roce inducido por la circulación hiperdinámica de estos animales. La tensión de roce regula la expresión NOS (Xiao y cols., 1997) y ha sido descrito en la secuencia del promotor del gen NOS un componente que interviene posiblemente en la respuesta (Marsden y cols., 1993). Por otra parte, se ha observado una estimulación de la NOS constitutiva en otras enfermedades que cursan con una circulación hiperdinámica, como la cirrosis hepática (Martin y cols., 1996) y la anemia por deficiencia de hierro (Ni y cols., 1997).

En tejidos de ratas hipotiroideas la actividad NOS muestra un modelo heterogéneo difícil de explicar, pero puede ser el resultado de cambios en la expresión de las diferentes isoformas de la NOS. De hecho, recientemente se ha observado (Carreras y cols., 2001), que la NOS está aumentada en mitocondrias de hígado y músculo esquelético en el hipotiroidismo, e inversamente correlacionada con el nivel de T<sub>3</sub> en suero, mientras que en tejidos neurales la actividad NOS está reducida (Ueta y cols., 1995).

El aumento y disminución de la actividad NOS en aorta de ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente, debido a la importancia del NO en el control del tono vascular (Moncada y cols., 1991), sugiere que esta alteración puede jugar un papel en los cambios de la resistencia vascular periférica total (Klein, 1990). Estos datos son consistentes con el aumento y disminución de la

respuesta a acetilcolina en riñones perfundidos y aortas aisladas de ratas hiper e hipotiroideas, respectivamente (Vargas y cols., 1995).

El óxido nítrico medular juega un mayor papel en la regulación de la excreción renal de sodio y agua y por consiguiente en el control de la presión arterial (Romero y cols., 1992). Los valores normales de actividad NOS en la médula de ratas hipotiroideas indican que la médula tiene una capacidad adecuada de sintetizar NO, el cual es coherente con el manejo normal de sodio de ratas hipotiroideas en condiciones normales y tras varios estímulos (Vargas y cols., 1994; Vargas y cols., 1991). Sin embargo, en la corteza renal de ratas hipertiroideas existe una alta actividad NOS, que puede ser como consecuencia de una circulación hiperdinámica, ya que, la actividad NOS cortical es principalmente producida por la eNOS (Mattson y Higgins, 1996). Los niveles similares de actividad NOS en la corteza y medula renal de ratas hipertiroideas puede producir una deficiente generación de NO en la medula renal, el cual podría participar en una nula respuesta de la presión diuresis natriuresis de estos animales (Vargas y cols., 1994).

También se ha observado que la actividad NOS en el ventrículo izquierdo de ratas hipertiroideas es el doble que en controles. Esta alteración puede ser como consecuencia de la alta presión sanguínea de estas ratas, y no por la circulación hiperdinámica o por el incremento de la frecuencia cardiaca, ya que la actividad NOS en el ventrículo derecho es similar a de los controles.

El incremento de la actividad NOS en estos tejidos de ratas hipertiroideas coincide con los resultados publicados en otros tejidos. Un estudio mostró que el hipertiroidismo inducido por T<sub>3</sub> dobló la actividad de transcripción del gen NOS en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON); mientras que en el hipotiroidismo se produjo una reducción muy significativa de la



actividad transcripcional del gen NOS en el PVN y SON (Ueta y cols., 1995). Fernández y colaboradores (1997), demostraron que el hipertiroidismo cursa con un aumento significativo y reversible de la actividad NOS en hígado de rata.

## 5. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR Y RENAL

Un radical libre se puede definir como aquella especie química que posee un electrón desapareado. Esta situación le confiere una alta capacidad de reacción, prácticamente con cualquier principio activo, lo que también condiciona su corta existencia. El radical libre que suele generar la existencia de las demás especies reactivas de oxígeno es el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Su origen en la célula se sitúa en la mitocondria y en las membranas celulares. En las membranas celulares realizan su función diversas enzimas (NADP/NADPH oxidasa, citocromo P-450, xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa) que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones y, consecuentemente, llevan a la formación del anión superóxido.

A partir del anión superóxido se forman el resto de especies reactivas de oxígeno, destacando el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), hipoclorito y cloraminas, así como los radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno. Ante estos productos tan reactivos el organismo dispone de sistemas defensivos antioxidantes endógenos, con características enzimáticas o no. Entre los primeros estarían la superóxido dismutasa (mitocondrial, citoplasmática y extracelular), la catalasa y el complejo glutatión peroxidasa-reductasa y otras peroxidasas hemoproteicas (Fernández y Videla, 1996). Entre los no enzimáticos se incluyen a moléculas hidrofílicas, como el glutatión

reducido (GSH) y el ácido ascórbico y a moléculas lipofílicas, como el  $\alpha$ -tocoferol y los carotenoides (Fernández y Videla, 1996), así como los estrógenos y la melatonina. Estos mecanismos de defensa antioxidantes se complementan con los sistemas celulares de reparación, que de forma coordinada y acoplados al metabolismo intermediario, logran mantener un nivel bajo de especies prooxidantes, compatible con la vida celular aeróbica (Fernández y Videla, 1996).

La corta vida de las especies reactivas es consecuencia del ataque al elemento próximo, aunque parecen mostrar especial avidez por los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de las membranas biológicas. El resultado de esta última reacción es una peroxidación lipídica en cadena, capaz de desestructurar y alterar las funciones de una membrana lisosomal, mitocondrial, endoplasmática o celular, modificando su permeabilidad y conduciendo eventualmente a la lisis y muerte celular (Tapia y cols., 1999). Cualquier sustrato es susceptible de ser alterado: proteínas, ácidos nucleicos, residuos tioles reducidos, etc, afectando su función. Conviene recordar que los radicales libres son también herramientas de las defensas celulares contra la agresión. Así, los leucocitos monocitos-macrófagos y células del llamado sistema retículo-endotelial (células endoteliales, células alveolares II, células de Kupffer, células gliales, etc.), una vez activados liberan importantes cantidades de radicales libres que ayudan a combatir la agresión y participan del proceso inflamatorio.

### **5.1. Estrés oxidativo y función vascular**

La participación del anión superóxido y otras especies reactivas en el control vascular se examina especialmente en relación con la función endotelial

(Wu, 1999). El equilibrio que resulta de la acción de los factores endoteliales inductores de vasoconstricción y proliferación celular (Ang II, endotelina, TXA<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, etc.) y los factores inductores de vasodilatación y antiproliferación (NO, prostaciclina, FHDE, etc.) es esencial para la homeostasis vascular. El óxido nítrico presenta características de radical libre y su reacción con el anión superóxido ocurre con gran facilidad. La consecuencia inmediata es la limitación de la biodisponibilidad del óxido nítrico, mientras que la consecuencia neta consiste en vasoconstricción y crecimiento vascular, alteraciones típicas de enfermedades o estados tales como la diabetes, insuficiencia renal, hipertensión y alteraciones cardiovasculares (Griendling y cols., 2000; Wilcox, 2002). En la vasculatura, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> disminuye la relajación dependiente de endotelio (Rubanyi y Vanhoutte, 1986a; Rubanyi y Vanhoutte, 1986b), mientras que la superóxido dismutasa (SOD) incrementa la vida media del NO y potencia la dilatación dependiente del endotelio (Gryglewski y cols., 1986). También se ha observado en diferentes modelos de hipertensión experimental como SHR (Wu y cols., 2001), DOCA-sal (Wu y cols., 2001), y ratas hipertensas por Ang II (Nishiyama y cols., 2001), una elevada producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en los vasos sanguíneos. Se ha constatado que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) mejoran la sensibilidad a la insulina y disminuyen el estrés oxidativo en pacientes (Yavuz y cols., 2003) y ratas (Chamorro y cols., 2004) hipertensas. La infusión aguda de angiotensina causa estrés oxidativo en hipertensos, indicando que el sistema renina-angiotensina contribuye al mismo (Murphey y cols., 2003). Mientras que otros autores, han podido comprobar que la administración de antioxidantes atenúa la hipertensión inducida por inhibición de la síntesis de óxido nítrico (Duarte y cols., 2002; Sainz y cols., 2005).

Como consecuencia de la actividad de las epoxigenasas citocromo P-450 de la pared vascular no solamente se producen los metabolitos vasoactivos del ácido araquidónico descritos (EETs), sino que también se generan aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Bondy y Naderi, 1994; Puntarulo y Cederbaum, 1998). La continua producción de las ERO parece ser una de las consecuencias más importantes del consumo de NADPH por las monooxigenasas microsomales, lo que implica que estas enzimas contribuyen de forma significativa a la producción de radicales libres de oxígeno (Davydov, 2001).

De esta forma, el óxido nítrico, por su condición de radical poco reactivo, realiza actividad antioxidante y muestra su faceta más beneficiosa. Su actuación es capaz de parar reacciones de peroxidación lipídica de las membranas celulares confiriéndoles estabilidad; además, le permite prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), evitando un factor de riesgo cardiovascular.

En determinadas situaciones en las que aumenta la formación de anión superóxido y de óxido nítrico, la reacción entre ellos es inevitable, formándose peroxinitrito (Prior y Squadrito, 1995). El peroxinitrito formado es un anión no radical el cual oxida de forma no enzimática al ácido araquidónico y libera un potente vasoconstrictor, el isoprostano (Haas y cols., 1999). Los niveles celulares de NO y  $O_2^-$  y su interacción tienen un gran impacto en los mecanismos que controlan la reactividad vascular (Mugge y cols., 1991; Omar y cols., 1991). Además, el  $O_2^-$  también puede actuar como un constrictor de la musculatura lisa vascular. Se ha propuesto que la acción vasoconstrictora del  $O_2^-$  se produce por abolición del efecto vasodilatador del NO, debido a que ambos radicales del oxígeno interaccionan entre ellos (Omar y cols., 1991;

Wolin y cols., 2000). Sin embargo, recientes evidencias indican que el  $O_2^-$  puede ejercer un efecto vasoconstrictor independientemente de los mecanismos del NO (Zou y cols., 2001), produciendo un aumento del tono simpático o directamente aumentando el calcio intracelular (Shokoji y cols., 2003). En síntesis, el efecto resultante de la acción de las ERO sobre el endotelio vascular es lo que reconocemos como disfunción endotelial, produciéndose un desplazamiento hacia estados donde predominan el tono vascular aumentado así como un mayor grado de proliferación de células vasculares. Particularmente relevante resulta la mediación que ejerce la activación de la NADPH oxidasa como origen del anión superóxido (Lasegue y Griendling, 2002) y consiguientemente de estrés oxidativo.

## **5.2. Radical superóxido y función renal**

En la última década se han acumulado evidencias que indican que las ERO juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades renales, produciendo daño vascular, glomerular, tubular e intersticial (Ichikawa y cols., 1994). Además, las ERO también juegan un papel relevante en la fisiología renal y el manejo renal de sodio. Así, recientemente se ha observado que un aumento de ingesta salina aumenta la generación de  $O_2^-$ , la excreción urinaria de isoprostano y de MDA acompañado de un aumento en la expresión y actividad de la NADPH-oxidasa con una disminuida expresión renal de superóxido dismutasa (Kitiyakara y cols., 2003). Estudios en la rata indican que la producción de  $O_2^-$  en la medula ejerce un efecto vasoconstrictor, antidiurético y antinatriurético (Zou y cols., 2001).

### **5.2.1. Interacción O<sub>2</sub>/NO en la función renal**

Existen muchas evidencias de que el NO y el O<sub>2</sub> interactúan y se contrarregulan recíprocamente en sus acciones sobre la función renal. Ambos ejercen acciones opuestas sobre las funciones tubular y vascular. Majid y colaboradores (2004), demostraron en perros, que el efecto diurético y natriurético del Tempol sólo ocurre en condiciones donde la NOS está bloqueada. Además, los efectos antinatriurético y vasoconstrictor del inhibidor de la SOD, DETC, se favorecen al bloquear la NOS (Majid y cols., 2002).

El NO actúa en múltiples puntos del ciclo del ácido cítrico e inhibe la utilización mitocondrial de oxígeno (Blantz y Weir, 2004). Esto tiene consecuencias importantes sobre la función excretora renal, ya que la mayor parte del oxígeno utilizado por el riñón se utiliza para la reabsorción tubular de sodio (Makino y cols., 2002). Desde una perspectiva fisiológica, la interacción antagónica entre el O<sub>2</sub> y el NO, podría regular el consumo de oxígeno y la reabsorción tubular de sodio en condiciones normales (Evans y Fitzgerald, 2005).

### **5.3. Estrés oxidativo en el hiper e hipotiroidismo**

Algunas evidencias indican que el hipertiroidismo en humanos y animales cursa con un incremento del estrés oxidativo (Tapia y cols., 1999; Fernández V y cols., 2002; Venditti y cols., 1997; Sewerynek y cols., 2000).

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel esencial en el metabolismo energético del organismo. El desarrollo de un estado hipertiroideo en mamíferos conduce a un aumento significativo de su metabolismo basal, caracterizado por un aumento en el consumo total de oxígeno de los tejidos

diana, efecto conocido como calorigénesis tiroidea. La inducción del hipertiroidismo experimental en la rata produce incrementos en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de oxidorreducción. A nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, aumenta la generación de EROS, como el radical superóxido y/o el peróxido de hidrógeno, y a nivel citoplasmático aumenta la generación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERNS), como el óxido nítrico (\*NO) y el peroxinitrito (ONOO-) (Tapia y cols., 1999; Fernández y col., 1997), siendo, éste último, un potente oxidante que participa en la oxidación de grupos sulfhidrilos, de lípidos y la nitración de residuos de tirosina, y en altas concentraciones es sumamente tóxico (Beckman y Koppenol, 1996; Combes y cols., 2001). Además puede oxidar de forma no enzimática al ácido araquidónico y liberar F<sub>2</sub>-isoprostano (Huie y Padmaja, 1993) que ejerce una potente vasoconstricción y efectos antinatriuréticos (Roberts y Morrow, 1997; Takahashi y cols., 1992).

#### **5.4. Efecto del Tempol en el estrés oxidativo y enfermedades cardiovasculares**

Ha sido estudiado por diversos autores que el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil o 4-hidroxi-tempo (Tempol), un mimético de la superóxido dismutasa permeable a la membrana celular, y otros antioxidantes disminuyen la presión arterial y la resistencia vascular renal en SHR (Schnackenberg y Wilcox., 1999; Duarte y cols., 2001) e hipertensión DOCA-sal (Beswick y cols., 2001), habiéndose observado también que esta droga disminuye la excreción urinaria del isoprostano F<sub>2</sub> $\alpha$  (Schnackenberg y cols., 1998), marcador de estrés oxidativo (Haas y cols., 1999).

El Tempol que produce una marcada reducción de la producción de  $O_2^-$  (Griendlind y cols., 2000; Wilcox, 2002; Wu y cols., 2001; Nishiyama y cols., 2001; Schnackenberg y Wilcox, 1999; Schnackenberg y cols., 1998) es el más utilizado en los estudios sobre estrés oxidativo renales y cardiovasculares.

Zou y colaboradores (2001), mostraron que la infusión, en intersticio renal, de dietiltiocarbamato (DETC) disminuye el flujo medular y que el Tempol tiene el efecto opuesto. Mostraron que la infusión de Tempol en la médula renal favorece la excreción urinaria de sodio.

Recientes estudios han mostrado que la administración aguda de Tempol disminuye en ratas SHR (Shokoji y cols., 2003) y DOCA-Sal (Xu y cols., 2004) respecto a ratas control, la presión sanguínea, la actividad nervioso simpático renal (ANSR), y la frecuencia cardíaca. Y Shokoji y colaboradores (2003), demostraron que un aumento en la producción del ión superóxido contribuye al desarrollo de la hipertensión a través de la activación del sistema nervioso simpático (SNS), y que el Tempol reduce la presión sanguínea, inhibiendo la actividad del SNS.

El bloqueo de la NOS por infusión intravenosa de L-NAME, suprime el efecto hipotensor del Tempol, lo que indica que el efecto anti-hipertensor o vasodilatador del Tempol depende de su acción supresora de  $O_2^-$ , que facilita la vasodilatación inducida por el NO (Schnackenberg y cols., 1998). Sin embargo, en ratas hipertensas tratadas con L-NAME, el Tempol disminuye significativamente la presión sanguínea (Sainz y cols., 2005). Además se ha observado que en ausencia de producción de NO, el  $O_2^-$  puede ejercer efectos vasoconstrictores independientes del mecanismo del NO (Majid y Nishiyama, 2002).



Otros estudios realizados *in vivo e in vitro*, han aportado como el Tempol es capaz de aumentar la biodisponibilidad del NO y la excreción de sodio en animales previamente tratados con Ang II cuyos efectos fisiológicos pueden estar mediados por un incremento del O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por la NADPH oxidasa (Lopez y cols., 2003).



## **II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS**



La disfunción tiroidea está acompañada de importantes alteraciones en la función cardiovascular. Así, el hipertiroidismo está relacionado con una circulación hiperdinámica, caracterizada por una hipertensión con un incremento del gasto cardíaco y una resistencia vascular reducida, mientras que el hipotiroidismo está caracterizado por una hipotensión arterial con un gasto cardíaco reducido y un incremento de la resistencia vascular (Klein y Ojamaa, 2001; Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998).

La disfunción tiroidea produce importantes cambios en la sensibilidad a VC y VD en vasos de conducción y de resistencia (Vargas y cols., 1988). Además, el hipotiroidismo previene y revierte algunos modelos experimentales de hipertensión (Vargas y cols., 1995), mientras que el hipertiroidismo acelera el curso de la hipertensión.

Es bien conocido que el endotelio puede modular el tono vascular del músculo liso vía síntesis y liberación de algunos factores relajantes derivados del endotelio (Furchgott y Vanhoutte, 1989). El NO y FHDE son los principales mediadores de la vasodilatación renal endotelio-dependiente (Vargas y cols., 1994); el primero parece jugar un importante papel en arterias de conducción, mientras que el FHDE es el más importante en vasos de resistencia (Campbell y Gaurthier, 2002). La síntesis de NO es inhibida por el L-NAME. El FHDE es una sustancia difusible no identificada que relaja el músculo liso vascular a través de la hiperpolarización vía apertura de canales de potasio (Brayden y cols., 1991; Vanhoutte, 1993). TEA y altas concentraciones de potasio han sido utilizadas para inhibir la actividad del FHDE.

Además, el endotelio ha sido postulado como un sensor de flujo y presión, factores que activan la liberación de factores relajantes derivados del endotelio (Rubanyi y cols., 1990). A este respecto la eliminación endotelial

aumenta la sensibilidad a VC en riñones aislados (Vargas y cols., 1996), y el incremento de respuesta también fue producido con la administración de L-NAME o TEA (Vargas y Osuna, 1996), indicando que el NO y FHDE modulan la respuesta a VC en riñones aislados.

Preparaciones de ratas hiper e hipotiroideas muestran cambios en la respuesta a VC y especialmente al agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, fenilefrina (Grieve y cols., 1999; Sabio y cols., 1994). Ha sido sugerido que el aumento de la producción de NO por el endotelio juega un papel en la hiporespuesta a Phe en ratas hipotiroideas (Grieve y cols., 1999). En contraste nuestro grupo no encontró evidencias bioquímicas (Quesada y cols., 2002) o funcionales (Vargas y cols., 1995) de tales incrementos de actividad NO en el hipotiroidismo. Además, el hipotiroidismo puede prevenir la hipertensión inducida con una dosis elevada de un inhibidor de NO (Vargas y cols., 1996) donde el incremento de la sensibilidad presora a VC juega un papel esencial (Vargas y cols., 1996), sugiriendo que el hipotiroidismo puede reducir la respuesta a VC incluso en ausencia de NO.

Sin embargo en el estado hipertiroideo si se obtuvieron evidencias de un aumento de actividad del NO. En ratas hipertensas hipertiroideas los vasos de conducción (aorta aislada) y de resistencia (riñón aislado) mostraron un incremento en la respuesta a ACh (Vargas y cols., 1995). Este incremento en la respuesta endotelio-dependiente en preparaciones de ratas hipertiroideas ha sido confirmado posteriormente por otros laboratorios (Büssemaker y cols., 2003; McAllister y cols., 1998; Iwata y Honda, 2004).

El estado hipertiroideo está acompañado de importantes alteraciones en funciones hemodinámicas, renal y cardiaca (Bradley y cols., 1974; Klein y Ojamaa, 1995; Larsen y cols., 1998). En ratas, la tiroxina produce hipertensión

(García-Estañ y cols., 1995; Klein y Ojamaa, 1995; Vargas y cols., 1991), hipertrofia renal y cardiaca, proteinuria y reduce la excreción renal de sodio (García-Estañ y cols., 1995; Vargas y cols., 1991; Bradley y cols., 1974).

El estado hipertiroidico en mamíferos está asociado con un aumento del metabolismo basal, caracterizado por un aumento en el consumo total de oxígeno de los tejidos diana, efecto conocido como calorigénesis tiroidea. La inducción del hipertiroidismo experimental en la rata produce incrementos en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de oxidación-reducción, incrementando la generación de ERO (Giavarotti y cols., 1998; Huh y cols., 1998). Además, se produce una importante disminución, en hígado, de la actividad de algunos sistemas de defensa antioxidante, como la SOD, la catalasa y GSH (Giavarotti y cols., 1998; Huh y cols., 1998). Este desequilibrio entre factores prooxidantes y antioxidantes condicionan un estrés oxidativo hepático (Tapia y cols., 1999; Venditti y cols., 1997).

Existen evidencias de que el estrés oxidativo, a través del ión superóxido y otras especies reactivas de oxígeno, contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes e insuficiencia renal (Griendling y cols., 2000; Wilcox, 2002). Varios estudios han demostrado que el estrés oxidativo, en ratas, está implicado en la patogénesis de la hipertensión arterial (Sainz y cols., 2005; Schnackenberg y cols., 1999). Además, se ha mostrado que el Tempol, un mimético de la SOD de bajo peso molecular metal-independiente y permeable a la membrana celular (Mitchell y cols., 1990), disminuye la presión sanguínea en ratas hipertensas (Sainz y cols., 2005; Schnackenberg y cols., 1999).

Las ERO juegan un importante papel en la patogénesis de enfermedades renales, produciendo daño vascular, glomerular, tubular e intestinal (Wilcox, 2002). Además, recientemente, se ha demostrado que las ERO también juegan un relevante papel en la hemodinámica renal y excreción de sodio (Zou y cols.,

2001). Ratas hipertiroideas muestran una reducida capacidad de excretar sodio después de una carga salina isotónica o hipertónica (Vargas y cols., 1991) y muestran una relación presión-natriuresis suprimida (García-Estañ y cols., 1995). Esta última alteración es desarrollada por inhibidores de Ang II (García-Estañ y cols., 1995), drogas que han mostrado recientemente propiedades antioxidantes (Chamorro y cols., 2004). Así, alteraciones en el manejo de sodio de ratas hipertiroideas pueden estar relacionadas con las enzimas que regulan el estrés oxidativo renal en esta enfermedad.

A pesar de haberse desarrollado estudios exhaustivos sobre el papel de las hormonas tiroideas en el estrés oxidativo hepático, aun no se ha estudiado que papel juega este aumento de estrés oxidativo en el desarrollo de las manifestaciones cardiovasculares (Asayama y cols., 1989; Gredilla y cols., 2001) y renales (Mori y Cowley, 2004; Sawant y cols., 2003) en la disfunción tiroidea.

Por estas razones, los objetivos planteados en el presente trabajo han sido:

- Analizar la hipótesis de que el NO y/o FHDE pueden participar en las alteraciones de las respuestas a VC y VD en el lecho vascular renal de ratas con disfunción tiroidea. Para explorar la contribución de estos mediadores, nosotros usamos TEA o altas concentraciones de potasio para inhibir la actividad del FHDE, y L-NAME para inhibir la síntesis de NO.
- Determinar si el hipertiroidismo está asociado con una disregulación de las principales enzimas antioxidantes como, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, en los principales órganos diana del hipertiroidismo, como el riñón (corteza y médula) y corazón



- (ventrículos izquierdo y derecho). Y comprobar, si la administración crónica del antioxidante mimético de la SOD, Tempol, reduce la presión sanguínea y otras variables de esta enfermedad endocrina, para determinar el papel del estrés oxidativo en la patogénesis de esta enfermedad endocrina.
- Finalmente se estudia el efecto del Tempol en la respuesta a VC para determinar si el Tempol reduce la PA en las ratas hipertiroideas a través de una reducción en la reactividad vascular a vasoconstrictores.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. Fármacos e instrumentos utilizados**

### **1.1. Fármacos**

Acetilcolina (Sigma).

Angiotensina II

Fenilefrina

L-NAME (Sigma).

Metimazol

Nitroprusiato sódico (Merck).

Papaverina

Pentobarbital Sódico (Serva).

TEA (Sigma).

Tempol (Sigma).

Tiroxina (Merck).

### **1.2. Instrumentos**

Balanza (Sartorius, Pacisa).

Bomba de perfusión.

Centrífuga (Grigel).

Espectrofotómetro.

Estufa (Selecta).

Hilos de sutura 000.

Jaulas metabólicas individuales (Tecniplast Gazzada, COD).

Pletismógrafo (Letica).

Autoanalizador Hitachi 912 (Roche).

## 2. Métodos experimentales

### 2.1. Animales y distribución

Para los experimentos realizados en la elaboración de esta tesis se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Comisión de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para cuidados éticos en animales de la Comunidad Europea.

Los animales fueron distribuidos de la siguiente forma:

**Experimento 1.** Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipotiroideas.

**Control:** Grupo control. (n=7).

**Hipotiroidea:** Grupo tratado con metimazol al 0.03% en agua. (n=7).

**Experimento 2.** Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipertiroideas.

**Control:** Grupo control. (n=7).

**Hipertiroidea:** Grupo tratado con Tiroxina (75 µg/rata/día). (n=7).

**Experimento 3.** Efecto de dosis crecientes de T<sub>4</sub> en las enzimas antioxidantes y el estado de estrés oxidativo en estos animales.

**Control:** Grupo control. (n=8).

**Hipertiroidea-10:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> (10 µg/rata/día). (n=8).

**Hipertiroidea-50:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> (50 µg/rata/día). (n=8).

**Hipertiroidea-75:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> (75 µg/rata/día). (n=8).

**Experimento 4.** Efecto del antioxidante Tempol en las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo.

**Control:** Grupo control. (n=8).

**Tempol:** Grupo tratado con Tempol (aproximadamente 18 mg/kg/día). (n=8).

**Hipertiroidea:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> (75 µg/rata/día). (n=8).

**Hipertiroidea+Tempol:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> y Tempol a las dosis indicadas anteriormente. (n=8).

**Experimento 5.** Efecto del Tempol en la respuesta renal a vasoconstrictores.

**Control:** Grupo control. (n=8).

**Tempol:** Grupo tratado con Tempol (aproximadamente 18 mg/kg/día). (n=8).

**Hipertiroidea:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> (75 µg/rata/día). (n=8).

**Hipertiroidea+Tempol:** Grupo tratado con T<sub>4</sub> y Tempol a las dosis indicadas anteriormente. (n=8).

## **2.2. Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía en rabo**

Se determina la presión arterial de forma incruenta en el rabo de la rata. El sistema utilizado consta de un manguito de presión conectado a una unidad de insuflado semiautomática y a la unidad transductora del pletismógrafo, a la que también se conecta un sensor neumático. La unidad transductora está conectada con la unidad de registro visual del pletismógrafo (LE 5001, Letica SA, Barcelona).

Se somete al animal a la temperatura de 36°C durante 30 minutos en una estufa ventilada, con objeto de producir la vasodilatación de la arteria del rabo. Alrededor del mismo, y en su extremo proximal, se coloca el manguito de presión. A continuación se coloca el sensor automático adecuado a la medida del grosor del rabo de la rata, de modo que quede ajustado y situado en la cara ventral del rabo junto al manguito.

La operación puede repetirse transcurrido al menos un minuto. Se realizan varias determinaciones sucesivas a la misma rata (de 10 a 15 aproximadamente) y se expresa la presión sistólica como la media de cinco determinaciones sucesivas estables, descartando las primeras y las últimas.

La presión arterial se determinó dos veces en semana a todas las ratas que previamente habían sido numeradas y clasificadas por grupos, separándolas en sus correspondientes jaulas.

### **2.3. Cateterización de la arteria femoral**

Tras anestesiarse a la rata, se rasura la zona inguinal. Se practica una incisión longitudinal y se disecciona el paquete vasculonervioso, separando con cuidado la arteria del resto de las estructuras. Una vez realizada la disección de la arteria, se pasan por debajo de ella 3 hilos de lino. Se procede entonces a ligar distalmente y se clampa proximalmente la arteria femoral, para después realizar un pequeño corte en la pared arterial por el que se introduce la cánula. Tras hacerla progresar aproximadamente 1 cm por el interior del vaso en dirección al corazón, se inmoviliza anudándola a la pared vascular con el hilo.



#### **2.4. Medida de la presión arterial y frecuencia cardiaca por registro directo**

Se determina la presión arterial media y el pulso directamente en la arteria femoral de la rata no sometida a anestesia (veinticuatro horas después de la cateterización). Para ello se introduce la rata en una jaula transparente de metacrilato, se retira el tapón que cierra la cánula de la arteria femoral y se conecta con un transductor mediante un circuito cebado con solución salina isotónica heparinizada.

El sistema está integrado por un transductor electromagnético (MacLab), que convierte en impulsos eléctricos las variaciones de presión ejercidos sobre su membrana. El transductor está conectado con un amplificador (MacLab) conectado a un ordenador donde se recoge el registro gráfico de la onda del pulso y las presiones arteriales sistólica (PAS) y diastólica (PAD), así como la frecuencia cardíaca. El transductor se calibra mediante un manómetro de mercurio en el rango de 0 a 250 mmHg. La Presión Arterial Media (PAM) se obtiene sumando a la presión diastólica un tercio de la Presión Diferencial (P.Dif.).

### **3. Protocolos experimentales**

#### **3.1. Experimento 1. Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipotiroideas.**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 180-200 gr., que fueron distribuidas al azar en los dos grupos descritos en el apartado 2.1. Todos los animales tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida

correspondiente para cada grupo de estudio. El estado hipotiroideo fue inducido mediante la administración oral de metimazol al 0,03% en agua de bebida.

El tratamiento fue administrado durante 6 semanas.

La eficiencia del tratamiento fue evaluado comparando los niveles de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en suero, presión arterial media (PAM), frecuencia cardiaca (FC), presión de pulso (PP), peso tiroideo (PT), peso del riñón (PR), peso ventricular total (PV), y peso corporal (PC) de las ratas controles y las tratadas con metimazol.

La PAM y la FC fueron registrados directamente en ratas conscientes (n=7/grupo), a través de un catéter de polietileno insertado en la arteria femoral y exteriorizado al dorso registrando los resultados a través del Letica 2000 de dos canales. La PA fue medida 24h después de la implantación del cateter y fueron tomadas muestras de sangre de la arteria caterizada para la determinación en suero de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> por la técnica de ELISA.

La técnica del riñón aislado y perfundido de rata consiste brevemente en canular el riñón a través de la arteria mesentérica para no impedir en ningún momento el flujo renal. Los riñones fueron colocados en una cámara mantenida a 37 °C. Se perfunde el órgano con una solución de tirode a 37°C a un flujo continuo (5 ml/min/g). En la línea de perfusión se inyectan los agonistas y se registran los cambios de presión de perfusión renal mediante un traductor de presión conectado a un polígrafo.

Las preparaciones fueron examinadas bajo tres condiciones experimentales detalladas a continuación:

El *experimento 1* fue diseñado para estudiar el efecto que tiene el bloqueo del NO o FHDE por la administración de L-NAME o TEA, respectivamente, en la respuesta renal a VC en riñones de ratas controles e hipotiroideas. La curva dosis-respuesta fue hecha con fenilefrina (Phe, 10<sup>-7</sup> hasta 10<sup>-5</sup> g/k) y

angiotensina II (Ang II,  $2.5 \times 10^{-9}$  hasta  $10^{-6}$  g/k), en este orden. Las curvas dosis-respuesta fueron realizadas bajo condiciones basales o después de la infusión de L-NAME ( $10^{-4}$  M) o TEA ( $3 \times 10^{-3}$  M). L-NAME o TEA fue infundido durante los 30 minutos de estabilización y durante la curva dosis-respuesta.

En el *experimento 2* se determina si el incremento inducido por TEA en la respuesta presora a VC es debido al bloqueo de FHDE o es un efecto directo de las células vasculares del músculo liso. Las curvas dosis-respuesta a Phe y Ang II fueron realizadas en preparaciones sin endotelio en presencia o ausencia de TEA ( $3 \times 10^{-3}$  M). El endotelio fue destruido pasando aire a través del riñón aislado durante 5 minutos. Para comprobar la eliminación del endotelio se midió la respuesta vasodilatadora a un bolo de dosis  $10^{-6}$  g de acetilcolina (ACh). Preparaciones con una respuesta vasodilatadora mayor al 10% fueron rechazadas.

En el *experimento 3* se analizó los efectos del bloqueo de NO y FHDE en la respuesta a vasodilatadores en riñones de ratas controles e hipotiroideos. En estos riñones, una vasodilatación renal inducida por ACh es producida por NO y FHDE, mientras que en riñones preconstreñidos con 80 mM  $K^+$ , el FHDE es bloqueado, y la vasodilatación renal inducida por ACh es mediada solamente por NO. En este experimento el NO fue bloqueado por L-NAME ( $10^{-4}$  M) y el FHDE por un incremento extracelular de potasio (80 mM). Se estudiaron las siguientes respuestas renales: vasodilatación dependiente de endotelio, acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$  hasta  $10^{-6}$  g/K), vasodilatación independiente de endotelio, el donante de NO, nitroprusiato (NP,  $10^{-7}$  hasta  $10^{-4}$  g/K), y vasodilatación independiente de endotelio, papaverina (PV,  $10^{-7}$  hasta  $10^{-4}$  g/K). Estas curvas dosis-respuestas fueron realizadas en riñones preconstreñidos con Phe ( $10^{-6}$  M), preconstreñidos con 80 mM KCl o con Phe+L-NAME ( $10^{-4}$  M). Para obtener la solución conteniendo 80 mM de

potasio, la concentración equimolar de NaCl fue reemplazada por KCl en la solución de tirode. Como las preparaciones de ratas hipotiroideas mostraron una reducción de respuesta a Phe, la dosis de este VC se ajustó para alcanzar un nivel similar de preconstricción ( $115 \pm 2$  mmHg) como el observado en preparaciones controles ( $112 \pm 2$  mmHg). Los cambios en la presión de perfusión renal (PPR) en respuesta a los VD fue expresada como porcentaje de la disminución en la vasoconstricción obtenida con Phe o KCl.

### **3.2. Experimento 2. Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipertiroideas.**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 180-200 gr., que fueron distribuidas al azar en los dos grupos descritos en el apartado 2.1. Todos los animales tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo de estudio. El estado hipertiroideo fue inducido mediante la administración subcutánea de tiroxina (Merck), 75  $\mu$ g/rata/día disuelto en salino isotónico 0,5 N NaOH. El tratamiento fue administrado durante 6 semanas.

La eficiencia del tratamiento fue evaluado comparando los niveles de  $T_4$  y  $T_3$  en suero, presión arterial media (PAM), frecuencia cardiaca (FC), presión de pulso (PP), peso tiroideo (PT), peso del riñón (PR), peso ventricular total (PV), y peso corporal (PC) en las ratas controles y las tratadas con tiroxina.

La PAM y la FC fueron registrados directamente como en el experimento anterior, al igual que la técnica empleada para aislar y perfundir los riñones de las ratas.

Las preparaciones fueron examinadas bajo dos condiciones experimentales detalladas a continuación:

El *experimento 1* fue diseñado para estudiar el efecto que tiene el bloqueo del NO o FHDE por la administración de L-NAME o TEA, respectivamente, en la respuesta renal a VC en riñones de ratas controles e hipertiroideas. La curva dosis-respuesta fue hecha con fenilefrina (Phe,  $10^{-7}$  hasta  $10^{-5}$  g/k). Las curvas dosis-respuesta fueron realizadas bajo condiciones basales o después de la infusión de L-NAME ( $10^{-4}$  M) o TEA ( $3 \times 10^{-3}$  M). L-NAME o TEA fue infundido durante los 30 minutos de estabilización y durante la curva dosis-respuesta.

En el *experimento 2* se analizó los efectos del bloqueo de NO y FHDE en la respuesta a vasodilatadores en riñones de ratas controles e hipertiroideas. En estos riñones, la vasodilatación renal inducida por ACh es producida por NO y FHDE, mientras que en riñones preconstreñidos con 80 mM  $K^+$ , el FHDE es bloqueado, y la vasodilatación renal inducida por ACh es mediada solamente por NO. En este experimento el NO fue bloqueado por L-NAME ( $10^{-4}$  M) y el FHDE por un incremento extracelular de potasio (80 mM). Se estudiaron las siguientes respuestas renales: vasodilatación dependiente de endotelio, acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$  hasta  $10^{-6}$ g/K) y vasodilatación independiente de endotelio, el donador de NO, nitroprusiato (NP,  $10^{-7}$  hasta  $10^{-4}$ g/K). Estas curvas dosis-respuestas fueron realizadas en riñones preconstreñidos con Phe ( $10^{-6}$  M), con Phe más L-NAME ( $10^{-4}$  M), con ambos vasodilatadores, o preconstreñidos con 80 mM KCl, con el vasodilatador, ACh. Para obtener la solución conteniendo 80 mM de potasio, la concentración equimolar de NaCl fue reemplazada por KCl en la solución de tiorde. Los cambios en la presión de perfusión renal (PPR) en respuesta a los VD fue expresada como porcentaje de la disminución en la vasoconstricción obtenida con Phe o KCl.

### **3.3. Experimento 3. Efecto de dosis crecientes de T<sub>4</sub> en las enzimas antioxidantes y el estado de estrés oxidativo en estos animales.**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 340-350 gr., que fueron distribuidas al azar en los cuatro grupos descritos en el apartado 2.1. Todas ellas tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo de estudio. El estado hipertiroideo fue inducido mediante la administración subcutánea de tiroxina (Merck) correspondiente a cada grupo (10, 50 y 75 µg/rata/día) disuelto en salino isotónico 0,5 N NaOH.

Cada grupo experimental está compuesto por 8 animales. El tratamiento fue mantenido durante 6 semanas.

El peso corporal (PC) y la presión arterial sistólica (PAS) fueron medidos una vez por semana durante el curso del experimento, mediante pletismografía en el rabo de ratas conscientes (según el método descrito en el apartado 2.2).

Al final del estudio, las ratas fueron introducidas en jaulas metabólicas con libre acceso a la comida y a sus respectivos líquidos de bebida. Después de dos días de adaptación, se controlaron durante otros dos días la ingesta de comida, la ingesta hídrica y la diuresis. Los valores obtenidos de cada día experimental fueron promediados para el estudio estadístico. Las variables urinarias medidas fueron diuresis, natriuresis, kaliuresis, proteinuria, aclaramiento de creatinina e isoprostanos.

Una vez completado el estudio metabólico, fue cateterizada la arteria femoral (técnica descrita en el apartado 2.3) para la obtención de mediciones de presión arterial y muestras sanguíneas. Tras un periodo de recuperación de 24 horas, se realizó el registro directo de presión arterial y frecuencia cardiaca

durante un periodo de 60 minutos por el método descrito en el apartado 2.4. Los valores obtenidos de los últimos 30 minutos fueron promediados para obtener el valor medio de la PA. Una vez completado el registro de presión, a través del catéter femoral, se obtuvo una muestra de sangre heparinizada que fue centrifugada para la obtención del plasma que fue utilizado para la determinación de las variables plasmáticas, siendo éstas las siguientes: creatinina, electrolitos plasmáticos, proteínas y MDA. Finalmente los animales fueron sacrificados mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (140 mg/Kg). Para el estudio morfológico se obtuvo el peso cardíaco (PC), el peso ventricular (PV) y el peso renal (PR). Las muestras de la corteza y médula renal y ambos ventrículos fueron rápidamente separados, limpiados y congelados en nitrógeno líquido, guardándose posteriormente a -70°C para el posterior estudio de las actividades enzimáticas.

#### **3.4. Experimento 4. Efecto del antioxidante Tempol en las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo.**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 340-350 gr., que fueron distribuidas al azar en los 4 grupos descritos en el apartado 2.1. Todas ellas tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo de estudio.

El estado hipertiroides fue inducido mediante la administración subcutánea de tiroxina (Merck) de 75 µg/rata/día disuelto en salino isotónico 0,5 N NaOH. El Tempol se dio en el agua de bebida a una concentración de 180 mg/l, lo cuál resultaba una ingesta diaria de 18 mg/Kg/día. La concentración de Tempol se ajustó cada dos días de acuerdo a su respectiva ingesta de

líquido, para asegurar que fueran administradas dosis similares del fármaco en todos los grupos.

Cada grupo experimental está compuesto por 8 animales.

El resto del experimento se realizó como se ha descrito en el apartado 3.3, salvo la actividad enzimática que no es medida en este estudio.

### **3.5. Experimento 5. Efecto del Tempol en la respuesta renal a vasoconstrictores.**

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 260-270 gr., que fueron distribuidas al azar en los 4 grupos descritos en el apartado 2.1. Todas ellas tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo de estudio.

El estado hipertiroides fue inducido mediante la administración subcutánea de tiroxina (Merck) de 75 µg/rata/día disuelto en salino isotónico 0,5 N NaOH. El Tempol se dio en el agua de bebida a una concentración de 180 mg/l, lo cual resultaba una ingesta diaria de 18 mg/Kg/día. La concentración de Tempol se ajustó cada dos días de acuerdo a su respectiva ingesta de líquido, para asegurar que fueran administradas dosis similares del fármaco en todos los grupos.

Cada grupo experimental está compuesto por 8 animales.

Los riñones fueron aislados, como se detalló anteriormente, y perfundidos con una tasa de flujo constante (5 ml/min/g. peso del riñón) con una solución de tirode dentro de una cámara mantenida a 37 °C. Las curvas dosis-respuesta fueron hechas con fenilefrina (Phe,  $10^{-7}$  hasta  $10^{-5}$  g/k) realizada bajo condiciones basales en preparaciones con y sin endotelio; y angiotensina II (Ang II,  $2.5 \times 10^{-9}$  hasta  $10^{-6}$  g/k), con el endotelio intacto.



Las preparaciones fueron examinadas bajo condiciones normales y después de pasar aire durante 5 min por el circuito de perfusión para retirar el endotelio. Para comprobar la eliminación del endotelio se midió la respuesta vasodilatadora a un bolo de dosis  $10^{-6}$  g de ACh. Preparaciones con una respuesta vasodilatadora mayor al 10% fueron rechazadas.

#### **4. Procedimientos analíticos**

##### **4.1. Homogeneizado**

El homogeneizado (25% peso/volumen) de riñón (corteza y médula) y corazón (ventrículo izquierdo y derecho) de cada animal fue preparado en una solución 50 mM de tampón fosfato potásico (pH 7.4), conteniendo 1 mM de EDTA, y 1 mM de DTT usando un homogenizador Politrón. Posteriormente, fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 min a 4°C para descartar los restos celulares. Seguidamente se realizó una precipitación cetónica (16-24 horas) en frío (4°C). Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. Del precipitado obtenido se preparó una dilución 1/100 y se almacenó a -70°C para su posterior medición enzimática.

##### **4.2. Determinaciones enzimáticas**

###### **4.2.1. Actividad Superóxido Dismutasa**

La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del radical superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y  $O_2$  proporcionando una importante defensa contra el radical  $O_2^-$ . Se distinguen tres isoenzimas, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD y extracelular.

Reactivos:

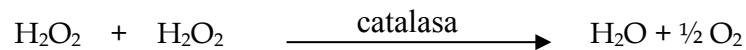
- Tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.6
- Solución 1 mM de Citocromo C en tampón fosfato.
- Solución 1 mM de Xantina en tampón fosfato.
- Xantina oxidasa

Técnica:

La actividad SOD fue medida espectrofotométricamente por el método de McCord con ligeras modificaciones. Se prepara en primer lugar un cóctel de reacción conteniendo 23 ml de tampón fosfato, 2.5 ml de xantina y 350  $\mu$ l de citocromo C. A continuación se prepara la reacción control, en una cubeta se adicionan 3 ml de este cóctel, y la cantidad necesaria de xantina oxidasa (10-70  $\mu$ l) para producir una absorbancia/min de 0.025 medido a 550 nm. Posteriormente se hace la reacción problema adicionando a otra cubeta 3 ml de cóctel, 30  $\mu$ l de muestra y la misma cantidad de xantina oxidasa adicionada en la reacción control y se calcula el porcentaje de inhibición. Una unidad de actividad es definida como la cantidad de superóxido dismutasa requerida para inhibir la reducción de Citocromo C en un 50%. La actividad enzimática se expresó en U/mg. Paralelamente se pueden hacer los mismos pasos anteriores añadiendo 30  $\mu$ l de CNK, el cual es un inhibidor selectivo de la Cu-Zn-SOD, para calcular la actividad Mn-SOD.

#### **4.2.2. Actividad Catalasa**

La CAT como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato.



Reactivos:

- Tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.6
- Peróxido de hidrógeno (30%)

Técnica:

La actividad catalasa fue determinada por el procedimiento de Aebi con algunas modificaciones. En una cubeta de 1.5 ml se adicionan 990  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato, y 2.5  $\mu\text{l}$  de muestra. Se suspende bien y a continuación se añaden 2.8  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se hace inmediatamente la lectura. La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede medirse directamente por el descenso de absorbancia a 240 nm durante 1 minuto cada 10 segundos. La actividad enzimática se expresó en  $\text{KU} \times 10^{-5} / \text{mg}$  (coeficiente de extinción molar,  $\epsilon = 0.041 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.2.3. Actividad Glutation Reductasa

La glutatión reductasa es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) utilizando como cofactor NADPH, jugando un importante papel en la defensa antioxidante.

Reactivos:

- Tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7.6).
- Solución de GSSG 20 mM en tampón fosfato potásico.
- Solución de  $\beta\text{NADPH}$  2 mM en agua destilada.

Técnica:

La actividad GR fue determinada por el procedimiento de Carlberg y Mannervik con pequeñas modificaciones. En una cubeta de cuarzo se añade 900  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato, 50  $\mu\text{l}$  de GSSG, 50  $\mu\text{l}$  de  $\beta\text{NADPH}$  y 50  $\mu\text{l}$  de muestra. Se monitorizó el descenso de absorbancia a 340 nm durante 2 minutos cada 5 segundos. La actividad enzimática se expresó como  $\text{mmoles} \times 10^3 / \text{mg}$  (coeficiente de extinción molar,  $\epsilon = 6.22 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.2.4. Actividad Glutathion Peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPX) utilizando GSH convierte el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres.

Reactivos:

- Se prepara un cócktel de 100 ml de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7.6) con los siguientes reactivos:
  - EDTA- $\text{Na}_2$  (solución final 2 mM).
  - GSH (solución final 1 mM).
  - $\text{NaN}_3$  (solución final 1 mM).
  - $\beta\text{NADPH}$  (solución final 0.2 mM).
  - 100 unidades de GR.
- Solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (solución final 1.5 mM).

Técnica:

La actividad fue medida espectrofotométricamente utilizando el método con algunas modificaciones de Clair y Chow. A 935  $\mu\text{l}$  de cócktel se añade 40  $\mu\text{l}$  de muestra y se deja incubando 3 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se adiciona a la mezcla 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , para dar comienzo la reacción. Se monitorizó el descenso de absorbancia a 340 nm durante 2 minutos cada 5 segundos. La actividad enzimática se expresó como  $\text{mmoles} \times 10^3 / \text{mg}$  (coeficiente de extinción molar,  $\epsilon = 6.22 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### 4.3. Determinación de malondialdehído

Como consecuencia del metabolismo celular normal, los radicales libres pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Este grado de peroxidación lipídica puede ser determinado cuantificando el malondialdehído (MDA).

Reactivos:

- Solución de ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0.375% (p/v) y HCl 0.25 N.

Técnica:

Determinado por el método de Ohkawa y cols. con algunas modificaciones. En tubos de vidrio con tapón de rosca se añadió 2 ml de la solución y 1 ml de muestra. Cada tubo fue agitado y cerrado con su tapón y llevado a un termoblock a 90°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se llevaron a un baño de agua-hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 5.000 r.p.m durante 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 535 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}/\text{l}$  (coeficiente de extinción molar,  $\epsilon = 1.563 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### **4.4. Determinación total de isoprostanos F<sub>2</sub>**

Para la determinación total de isoprostanos F<sub>2</sub>, las muestras de orina se hidrolizaron por incubación a 40 °C durante 90 min con NaOH 10 N. Las muestras se llevaron a frío y se neutralizaron con HCl 2 N. Después de la centrifugación, el sobrenadante se recogió para el análisis. Los isoprostanos F<sub>2</sub> totales se midieron por enzimoimmunoensayo competitivo.

#### **4.5. Determinación de sodio, potasio, creatinina y proteínas**

Estas determinaciones tanto plasmáticas como urinarias, fueron realizadas en un autoanalizador (Hitachi 912, Roche).

#### **4.6. Determinación de proteínas en tejidos**

Se determinó mediante espectrofotometría utilizando el método descrito por Lowry.

### **5. Métodos estadísticos**

Los valores son expresados como media  $\pm$  error estándar. Las curvas dosis-respuesta en los diferentes grupos experimentales se compararon utilizando un diseño anidado, con grupos y dosis como factores fijos, y el riñón como factor aleatorio. Cuando el análisis entre la interacción grupo-dosis fueron significativas, se compararon los grupos a distintas dosis. Los valores ED<sub>50</sub> se compararon usando el test de Wilcoxon.

La evolución de la presión arterial sistólica y frecuencia cardiaca fueron comparadas utilizando un diseño anidado. Cuando las diferencias fueron

significativas se utilizó el método de Bonferroni con el error apropiado para determinar la procedencia de la significación.

El análisis de las variables al final del experimento se realizó utilizando el análisis de una vía ANOVA, realizando posteriormente comparaciones por parejas con el test de Newmann-Keuls.





#### ***IV. RESULTADOS***



## 1. Resultados. Tablas.

### EXPERIMENTO 1: Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipotiroideas.

#### 1. Variables Biológicas

**Tabla 1. Variables biológicas y niveles en suero de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en ratas controles e hipotiroideas.**

Peso corporal (PC), peso ventricular total (PV), peso del riñón (PR), peso tiroideo (PT), presión arterial media (PAM), presión de pulso (PP), frecuencia cardiaca (FC) y niveles de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en suero, medidos al final del periodo experimental de ratas controles e hipotiroideas.

Grupos	Control	Hipotiroideas
PC (g)	402 ± 4	255 ± 4*
PV (mg)	940 ± 27	571 ± 17*
PR (mg)	1118 ± 40	830 ± 28*
PT (mg)	40,2 ± 3	125 ± 7,3*
PAM (mmHg)	115 ± 2	102 ± 3*
FC (pulsos/min)	380 ± 7	315 ± 7*
PP (mmHg)	45 ± 2	30 ± 2*
T <sub>4</sub> (µg/dl)	4,5 ± 0,5	0,3 ± 0,1*
T <sub>3</sub> (µg/dl)	55 ± 6	5,9 ± 1,2*

Valores expresados como media ± error estándar. \* P<0.01 versus grupo control.

## 2. Curvas dosis-respuesta

**Tabla 2. ED<sub>50</sub> y respuesta máxima en preparaciones con el endotelio intacto.**

Grupos	ED <sub>50</sub> , - log g	Respuesta máxima
<b>Fenilefrina</b>		
Control	6.09 ± 0.03	215 ± 8.1
Control + NAME	6.52 ± 0.04 <sup>+</sup>	203 ± 5.5
Control + TEA	6.60 ± 0.07 <sup>+</sup>	205 ± 8.3
Hipotiroidea	5.92 ± 0.04 <sup>*</sup>	156 ± 4.4 <sup>*</sup>
Hipotiroidea + NAME	6.18 ± 0.05 <sup>++</sup>	167 ± 6.1 <sup>*</sup>
Hipotiroidea + TEA	6.04 ± 0.04 <sup>*</sup>	162 ± 9.7 <sup>*</sup>
<b>Angiotensina II</b>		
Control	7.69 ± 0.07	105 ± 7.6
Control + NAME	8.42 ± 0.02 <sup>+</sup>	148 ± 6.5 <sup>+</sup>
Control + TEA	8.39 ± 0.05 <sup>+</sup>	136 ± 7.5 <sup>+</sup>
Hipotiroidea	8.04 ± 0.11	117 ± 7.9
Hipotiroidea + NAME	8.15 ± 0.07	103 ± 4.6 <sup>*</sup>
Hipotiroidea + TEA	8.25 ± 0.05	88 ± 7.2 <sup>*</sup>

Valores expresados como media ± error estándar. \* P<0.05 versus grupo control. + P<0.05 versus grupo no tratado.

**Tabla 3. ED<sub>50</sub> y respuesta máxima en preparaciones sin endotelio.**

Grupos	ED <sub>50</sub> , - log g	Respuesta máxima
<b>Fenilefrina</b>		
Control	6,62 ± 0,03	185 ± 8,50
Control + TEA	6,60 ± 0,04	180 ± 12,1
Hipotiroidea	6,49 ± 0,04 <sup>*</sup>	157 ± 10,9 <sup>*</sup>
Hipotiroidea + TEA	6,20 ± 0,05 <sup>*</sup>	152 ± 11,0 <sup>*</sup>
<b>Angiotensina II</b>		
Control	8,01 ± 0,10	134 ± 20,9
Control + TEA	8,40 ± 0,12	136 ± 13,2
Hipotiroidea	8,02 ± 0,06	126 ± 16,4
Hipotiroidea + TEA	8,12 ± 0,07	116 ± 17,7

Valores expresados como media ± error estándar. \* P<0.05 versus grupo control.

**EXPERIMENTO 2: Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipertiroideas.**

**1. Variables Biológicas**

**Tabla 4. Variables biológicas y niveles en suero de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en ratas controles e hipertiroideas.**

Peso corporal (PC), peso ventricular total (PV), peso del riñón (PR), peso tiroideo (PT), presión arterial media (PAM), presión de pulso (PP), frecuencia cardiaca (FC) y niveles de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en suero, medidos al final del periodo experimental de ratas controles e hipertiroideas.

Grupos	Control	Hipertiroideas
PC (g)	402 ± 4	332 ± 13*
PV (mg)	940 ± 27	1145 ± 30*
PR (mg)	1118 ± 40	1620 ± 38*
PT (mg)	40,2 ± 3	22.3 ± 1.0*
PAM (mmHg)	115 ± 2	147 ± 3*
FC (pulsos/min)	380 ± 7	407 ± 10
PP (mmHg)	45 ± 2	72 ± 4*
T <sub>4</sub> (µg/dl)	4,5 ± 0,5	40.1 ± 1.5*
T <sub>3</sub> (µg/dl)	55 ± 6	320 ± 7.1*

Valores expresados como media ± error estándar. \* P<0.01 versus grupo control.

**Tabla 5. ED<sub>50</sub> y respuesta máxima en preparaciones con el endotelio intacto.**

Grupos	ED <sub>50</sub> , - log g	Respuesta máxima
Fenilefrina		
Control	6.09 ± 0.03	215 ± 8.1
Control + NAME	6.52 ± 0.04 <sup>+</sup>	203 ± 5.5
Control + TEA	6.60 ± 0.07 <sup>+</sup>	205 ± 8.3
Hipertiroidea	6,10 ± 0.04	200 ± 8,2
Hipertiroidea + NAME	6,50 ± 0.02 <sup>*</sup>	205 ± 6,3
Hipertiroidea + TEA	6,59 ± 0.04 <sup>*</sup>	228 ± 11,3

Valores expresados como media ± error estándar. \* P<0.05 versus grupo control. +P<0.05 versus grupo no tratado.

**EXPERIMENTO 3. Efecto del incremento de la dosis de T<sub>4</sub> en las enzimas antioxidantes y el estado de estrés oxidativo en estos animales.**

**1. Variables morfológicas**

**Tabla 6. Variables morfológicas absolutas.**

Incremento del peso corporal ( $\Delta$ PC), peso corporal final (PCF), peso del riñón (PR), peso del ventrículo izquierdo (PVI) y peso del ventrículo derecho (PVD), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	$\Delta$ PC, g	PCF, g	PR, mg	PVI, mg	PVD, mg
Control	66.7 $\pm$ 9	397.5 $\pm$ 7.2	926 $\pm$ 23	660 $\pm$ 22	118 $\pm$ 8
T <sub>4</sub> (10 $\mu$ g/kg)	6.5 $\pm$ 3*	352.2 $\pm$ 9.5*	880 $\pm$ 20	705 $\pm$ 18	170 $\pm$ 7**
T <sub>4</sub> (50 $\mu$ g/kg)	-27.6 $\pm$ 4**	328.0 $\pm$ 10.6**	960 $\pm$ 18	679 $\pm$ 17	165 $\pm$ 9**
T <sub>4</sub> (75 $\mu$ g/kg)	-37.4 $\pm$ 6**	312.0 $\pm$ 12.1**	1010 $\pm$ 35	689 $\pm$ 20	178 $\pm$ 12**

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05; \*\*p<0.01 versus control.

**Tabla 7. Variables morfológicas relativas.**

Peso del riñón, peso del ventrículo izquierdo y peso del ventrículo derecho en valores relativos al peso corporal, expresados respectivamente como los índices PR/PC, PVI/PC y PVD/PC, y tasa VI/VD, al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	PR/PC, mg/g	PVI/PC, mg/g	PVD/PC, mg/g	VI/VD
Control	2.33 ± 0.06	1.66 ± 0.05	0.27 ± 0.01	5.63 ± 0.42
T <sub>4</sub> (10µg/kg)	2.52 ± 0.08	2.01 ± 0.05*	0.45 ± 0.02*	4.04 ± 0.61*
T <sub>4</sub> (50µg/kg)	2.89 ± 0.10*	2.07 ± 0.07*	0.52 ± 0.02**	4.01 ± 0.29*
T <sub>4</sub> (75µg/kg)	3.04 ± 0.12*	2.21 ± 0.07*	0.60 ± 0.04**	4.06 ± 0.35*

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05; \*\*p<0.01 versus control.

## 2. Variables plasmáticas

### Tabla 8. Niveles de sodio y potasio plasmáticos.

Valores plasmáticos medios de sodio y potasio medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	Na, mEq/l	K, mEq/l
Control	143.83 ± 0.46	4.78 ± 0.25
T <sub>4</sub> (10 µg/kg)	144.21 ± 0.76	4.50 ± 0.14
T <sub>4</sub> (50 µg/kg)	144.36 ± 0.56	4.45 ± 0.06
T <sub>4</sub> (75µg/kg)	146.93 ± 0.70	4.41 ± 0.13

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05 versus control.

### Tabla 9. Creatinina, proteínas totales y malondialdehído plasmáticos.

Valores plasmáticos medios de creatinina, proteínas totales y malondialdehído (MDA), medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.



Grupos	Creatinina, mg/dl	Proteína Total, g/dl	MDA, $\mu\text{M/l}$
Control	0.68 $\pm$ 0.03	5.76 $\pm$ 0.06	6.8 $\pm$ 1.2
T <sub>4</sub> (10 $\mu\text{g/kg}$ )	0.63 $\pm$ 0.01	5.88 $\pm$ 0.06	7.2 $\pm$ 1.5
T <sub>4</sub> (50 $\mu\text{g/kg}$ )	0.63 $\pm$ 0.01	5.76 $\pm$ 0.05	8.5 $\pm$ 0.5*
T <sub>4</sub> (75 $\mu\text{g/kg}$ )	0.77 $\pm$ 0.03*	5.34 $\pm$ 0.08*	10.2 $\pm$ 1.3*

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05 versus control.

### 3. Variables urinarias

#### Tabla 10. Diuresis, natriuresis y kaliuresis.

Valores medios de la diuresis y de la excreción de sodio y de potasio, en orina de 24 horas, medidos al final del periodo experimental, expresados por cada 100 g de peso de animal, en los diferentes grupos.

Grupos	Diuresis, ml/100 g	Na, $\mu\text{mol/100 g}$	K, $\mu\text{mol/100 g}$
Control	2.07 $\pm$ 0.10	373.85 $\pm$ 18.32	608.08 $\pm$ 24.65
T <sub>4</sub> (10 $\mu\text{g/kg}$ )	2.33 $\pm$ 0.17	379.25 $\pm$ 23.25	614.01 $\pm$ 36.54
T <sub>4</sub> (50 $\mu\text{g/kg}$ )	3.84 $\pm$ 0.72	386.96 $\pm$ 26.79	626.94 $\pm$ 39.04
T <sub>4</sub> (75 $\mu\text{g/kg}$ )	9.87 $\pm$ 2.23*	496.88 $\pm$ 38.7*	897.60 $\pm$ 185.58*

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05 versus control.

#### Tabla 11. Proteinuria, aclaramiento de creatinina e isoprostanos.

Valores medios de la proteinuria, del aclaramiento de creatinina (CICr) e isoprostanos en orina de 24 horas, medidos al final del periodo experimental, en los diferentes grupos.

Grupos	P.T., mg/100 g	ClCr, ml/min/g riñón	Isoprostanos, $\mu\text{g}$
Control	$2.32 \pm 0.18$	$0.71 \pm 0.05$	$6.5 \pm 0.9$
T <sub>4</sub> (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$2.39 \pm 0.16$	$0.66 \pm 0.03$	$7.9 \pm 0.7$
T <sub>4</sub> (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$3.47 \pm 0.33^*$	$0.61 \pm 0.03$	$10.6 \pm 1.1^*$
T <sub>4</sub> (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$8.44 \pm 0.7^{**}$	$0.47 \pm 0.04^*$	$12.5 \pm 1.2^*$

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus control.

**EXPERIMENTO 4. Efecto antioxidante del Tempol en las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo.**

**1. Variables morfológicas**

**Tabla 12. Variables morfológicas absolutas.**

Incremento del peso corporal ( $\Delta PC$ ), peso corporal final (PCF), peso del riñón (PR), peso del ventrículo izquierdo (PVI) y peso del ventrículo derecho (PVD), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	$\Delta PC$ , g	PCF, g	PR, mg	PVI, mg	PVD, mg
Control	66.7 $\pm$ 9	397.5 $\pm$ 7.2	926 $\pm$ 23	660 $\pm$ 22	118 $\pm$ 8
Tempol	74.7 $\pm$ 11	390.5 $\pm$ 8.5	916 $\pm$ 34	660 $\pm$ 15	121 $\pm$ 10
T <sub>4</sub> (75 $\mu$ g/kg)	-37.4 $\pm$ 6**	312.0 $\pm$ 12.1**	1010 $\pm$ 35	689 $\pm$ 20	178 $\pm$ 12**
T <sub>4</sub> +Tempol	-35.4 $\pm$ 7**	333.2 $\pm$ 11.1**	1004 $\pm$ 27	794 $\pm$ 8	190 $\pm$ 14**

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*\*p<0.01 versus control.

**Tabla 13. Variables morfológicas relativas.**

Peso del riñón, peso del ventrículo izquierdo y peso del ventrículo derecho en valores relativos al peso corporal, expresados respectivamente como los índices PR/PC, PVI/PC y PVD/PC, y tasa VI/VD, al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	PR/PC, mg/g	PVI/PC, mg/g	PVD/PC, mg/g	VI/VD
Control	2.33 ± 0.06	1.66 ± 0.05	0.27 ± 0.01	5.63 ± 0.42
Tempol	2.34 ± 0.08	1.69 ± 0.03	0.30 ± 0.01	5.43 ± 0.30
T <sub>4</sub> (75µg/kg)	3.04 ± 0.12*	2.21 ± 0.07*	0.60 ± 0.04**	4.06 ± 0.35*
T <sub>4</sub> +Tempol	3.02 ± 0.04*	2.39 ± 0.05*	0.58 ± 0.05**	4.07 ± 0.44*

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05; \*\*p<0.01 versus control.

## 2. Variables plasmáticas

### Tabla 14. Niveles de sodio y potasio plasmáticos.

Valores plasmáticos medios de sodio y potasio medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	Na, mEq/l	K, mEq/l
Control	143.83 ± 0.46	4.78 ± 0.25
Tempol	145.36 ± 0.48	4.33 ± 0.10
T <sub>4</sub> (75µg/kg)	146.93 ± 0.70	4.41 ± 0.13
T <sub>4</sub> +Tempol	145.07 ± 0.69	4.60 ± 0.18

Valores expresados como media ± error estándar. \*p<0.05 versus control.

### Tabla 15. Creatinina, proteínas totales y malondialdehído plasmáticos.

Valores plasmáticos medios de creatinina, proteínas totales y malondialdehído, medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	Creatinina, mg/dl	Proteína Total, g/dl	MDA, $\mu$ M/l
Control	0.68 $\pm$ 0.03	5.76 $\pm$ 0.06	6.8 $\pm$ 1.2
Tempol	0.65 $\pm$ 0.01	5.83 $\pm$ 0.13	6.3 $\pm$ 0.2
T <sub>4</sub> (75 $\mu$ g/kg)	0.77 $\pm$ 0.03*	5.34 $\pm$ 0.08*	10.2 $\pm$ 1.3*
T <sub>4</sub> +Tempol	0.73 $\pm$ 0.02*	5.35 $\pm$ 0.06*	7.5 $\pm$ 0.8

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05 versus control.

### 3. Variables urinarias

#### Tabla 16. Diuresis, natriuresis y kaliuresis.

Valores medios de la diuresis y de la excreción de sodio y de potasio, en orina de 24 horas, medidos al final del periodo experimental, expresados por cada 100 g de peso de animal, en los diferentes grupos.

Grupos	Diuresis, ml/100 g	Na, $\mu$ mol/100 g	K, $\mu$ mol/100 g
Control	2.07 $\pm$ 0.10	373.85 $\pm$ 18.32	608.08 $\pm$ 24.65
Tempol	1.79 $\pm$ 0.24	327.25 $\pm$ 26.22	588.33 $\pm$ 37.96
T <sub>4</sub> (75 $\mu$ g/kg)	9.87 $\pm$ 2.23*	496.88 $\pm$ 38.7*	897.60 $\pm$ 185.58*
T <sub>4</sub> +Tempol	6.81 $\pm$ 1.7*	502.21 $\pm$ 30.83*	839.51 $\pm$ 32.78*

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \*p<0.05 versus control.

#### Tabla 17. Proteinuria, aclaramiento de creatinina e isoprostanos en orina.

Valores medios de la proteinuria, del aclaramiento de creatinina (CICr) e isoprostanos en orina de 24 horas, medidos al final del periodo experimental, en los diferentes grupos.

Grupos	P.T., mg/100 g	ClCr, ml/min/g riñón	Isoprostanos, $\mu\text{g}$
Control	$2.32 \pm 0.18$	$0.71 \pm 0.05$	$6.5 \pm 0.9$
Tempol	$2.17 \pm 0.19$	$0.64 \pm 0.04$	$5.8 \pm 0.7$
T <sub>4</sub> (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$8.44 \pm 0.7^{**}$	$0.47 \pm 0.04^*$	$12.5 \pm 1.2^*$
T <sub>4</sub> +Tempol	$7.34 \pm 1.04^{**}$	$0.51 \pm 0.02^*$	$7.5 \pm 0.6^+$

Valores expresados como media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus control, + $p < 0.05$  comparado con el grupo T<sub>4</sub>.

## **2. Descripción de resultados.**

### **2.1. EXPERIMENTO 1: Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipotiroideas.**

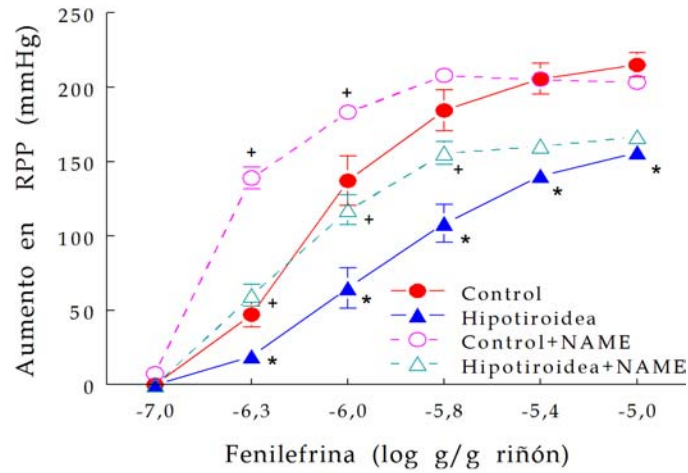
#### **2.1.1. Variables biológicas**

Los efectos de la administración de metimazol (MTZ) en las variables biológicas están representados en la tabla 1. Los animales tratados con metimazol durante 6 semanas ganaron significativamente menos peso que sus controles durante este periodo. Presión arterial media (PAM), presión de pulso (PP), frecuencia cardiaca (FC), peso del riñón (PR), peso ventricular total (PV), y niveles de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en suero disminuyeron en ratas hipotiroideas. El peso tiroideo (PT) aumentó en ratas hipotiroideas. Por consiguiente, las ratas tratadas con metimazol durante 6 semanas desarrollaron las manifestaciones características del estado hipotiroideo.

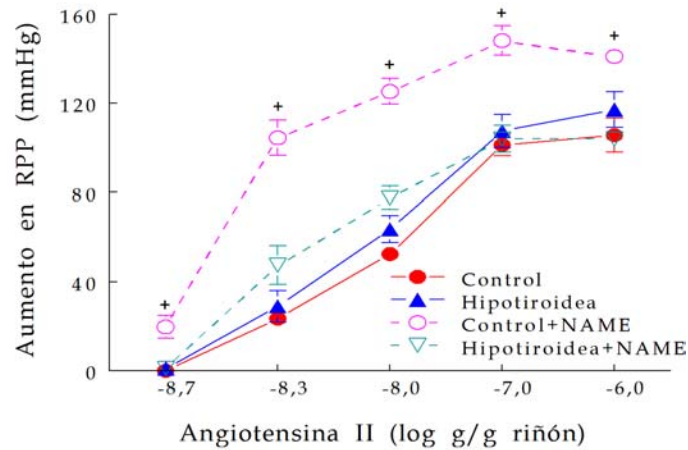
#### **2.1.2. Respuesta a vasoconstrictores**

La vasculatura renal de ratas hipotiroideas mostró una sensibilidad a Phe marcadamente reducida (Fig. 1 y tabla 2). La curva dosis-respuesta estuvo representada por un desplazamiento hacia la derecha, con una reducida respuesta a concentraciones iniciales e intermedias y una respuesta máxima menor.

Sin embargo, la vasculatura renal de ratas hipotiroideas mostró una curva dosis-respuesta a Ang II similar a la de los controles (Fig. 2 y tabla 2).



**Figura 1:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados de ratas controles e hipotiroideas (n=7 en cada grupo) en condiciones normales y después de administrar N<sup>o</sup>-nitro-L-arginametilester (10<sup>-4</sup> M, L-NAME). RPP, presión de perfusión renal. Los datos son medias ± error estándar. \*P<0.05 comparados con el grupo control. +P<0.05 comparados con sus respectivos grupos sin tratar.

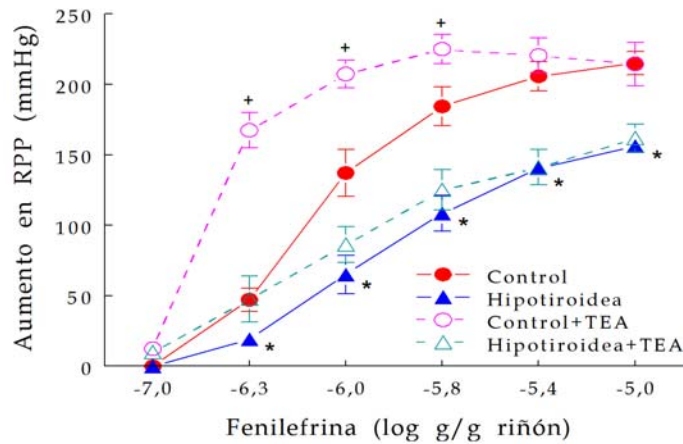


**Figura 2:** Curva dosis-respuesta a Ang II en riñones aislados de ratas controles e hipotiroideas (n=7 en cada grupo) en condiciones normales y después de administrar L-NAME (10<sup>-4</sup> M). Los datos son medias ± error estándar. +P<0.05 comparados con sus respectivos grupos sin tratar.



La administración de L-NAME produjo un aumento de sensibilidad a Phe en preparaciones controles e hipotiroideas (Fig. 1 y tabla 2). Las curvas dosis-respuesta estuvieron caracterizadas por una mayor sensibilidad a concentraciones bajas e intermedias, con una respuesta máxima similar. Consecuentemente las curvas se desplazaron hacia la izquierda de una manera no paralela. Las diferencias entre los riñones controles e hipotiroideos se mantuvieron después de la administración de L-NAME.

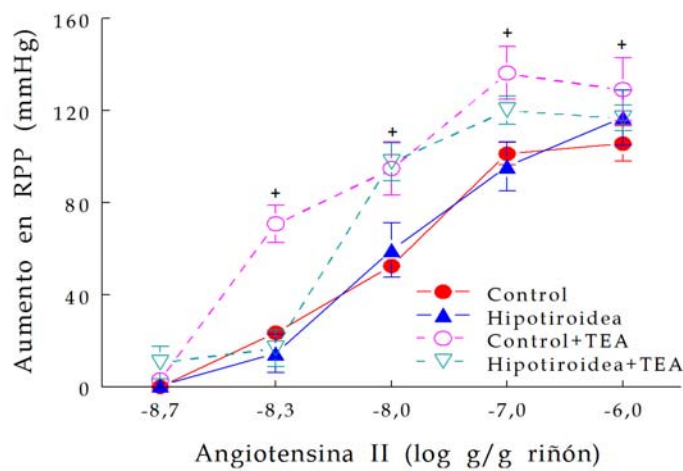
El efecto de la administración de TEA en la curva dosis-respuesta a Phe fue similar al efecto del L-NAME en ratas controles, pero no fue capaz de desplazar esta curva dosis-respuesta hacia la izquierda en preparaciones hipotiroideas (Fig. 3 y tabla 2). Por consiguiente, se observaron mayores diferencias entre preparaciones controles e hipotiroideas después de la administración de TEA que en condiciones basales en las dosis de Phe bajas e intermedias.



**Figura 3:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados de ratas controles e hipotiroideas (n=7 en cada grupo) en condiciones normales y después de administrar tetraetilamonio ( $3 \times 10^{-3} \text{M}$  TEA). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*P<0.05 comparados con el grupo control. +P<0.05 comparados con su respectivo grupo sin tratar.

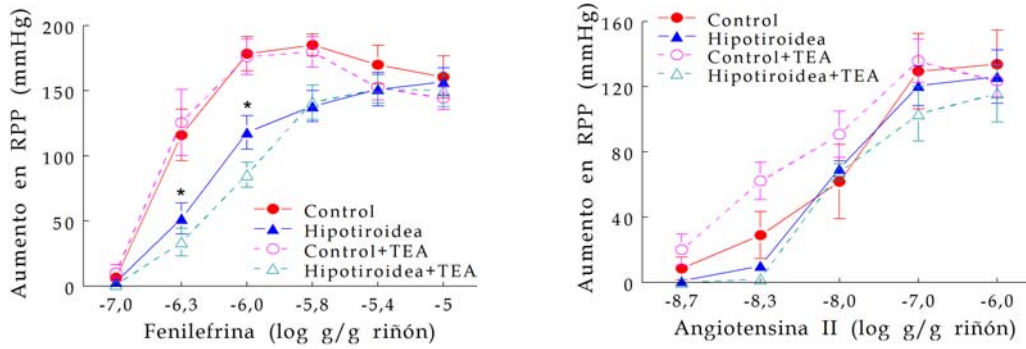
L-NAME produjo un desplazamiento paralelo hacia la izquierda en la curva dosis respuesta a Ang II en preparaciones controles, mientras que esta curva dosis-respuesta se mantuvo casi superpuesta después de la administración de L-NAME en los riñones hipotiroideos (Fig. 2 y tabla 2).

La administración de TEA también desplazó la curva dosis respuesta a Ang II hacia la izquierda en las ratas controles, pero no fue capaz de modificar la curva dosis-respuesta a Ang II en los riñones hipotiroideos (Fig. 4 y tabla 2).



**Figura 4:** Curva dosis-respuesta a Ang II en riñones aislados de ratas controles e hipotiroideas (n=7 en cada grupo) en condiciones normales y después de administrar TEA ( $3 \times 10^{-3}M$ ). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. +P<0.05 comparados con sus respectivos grupos sin tratar.

Al quitar el endotelio se produjo un incremento de la sensibilidad a VC en ambos grupos, manteniéndose las diferencias entre ellos (Fig. 5). El TEA no fue capaz de aumentar la sensibilidad a VC en preparaciones sin endotelio (Fig. 5 y tabla 3).



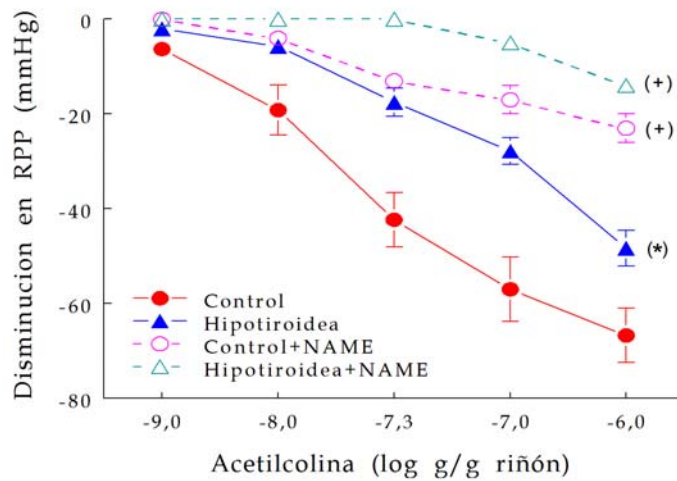
**Figura 5:** Curva dosis-respuesta a Phe (A) y Ang II (B) en riñones aislados de ratas controles e hipotiroideas (n=7 en cada grupo) después de quitar el endotelio y ser tratadas y no tratadas con TEA ( $3 \times 10^{-3}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*P<0.05 comparados con el grupo control.

### 2.1.3. Respuesta a vasodilatadores

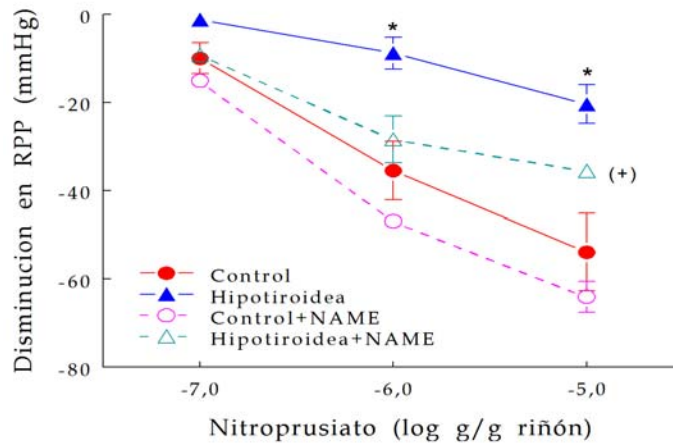
En riñones aislados y perfundidos de las ratas controles e hipotiroideas preconstrañidas con Phe, la administración de un bolo de ACh, NPS y PV produjo, a medida que aumentó la dosis, una disminución de la presión de perfusión renal (Fig. 6, fig. 7 y fig. 8).

Los riñones de las ratas hipotiroideas mostraron una marcada disminución de la sensibilidad a ACh, con diferencias significativas en toda la curva dosis-respuesta, así como en la respuesta máxima (Fig. 6). La sensibilidad a NPS fue atenuada significativamente en los riñones hipotiroideos (Fig. 7), mientras que la curva dosis-respuesta a PV fue similar en las preparaciones controles e hipotiroideas (Fig. 8)

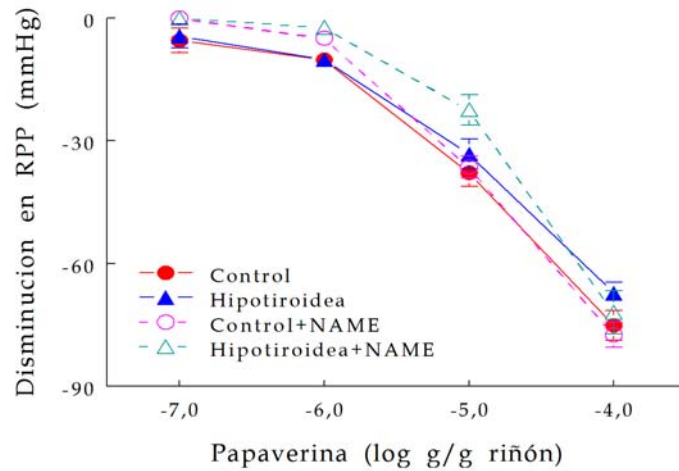
La administración de L-NAME atenuó la curva dosis-respuesta a ACh (Fig. 6), y aumentó la sensibilidad a NPS en ambos grupos (Fig. 7). Las diferencias entre las preparaciones controles e hipotiroideas en las curvas dosis-respuesta a ACh y NPS fueron mantenidas después de la administración de L-NAME. L-NAME no afectó a la curva dosis-respuesta a PV en los riñones controles e hipotiroideos.



**Figura 6:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de acetilcolina (ACh) en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipotiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe+L-NAME ( $10^{-4}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \* $P < 0.05$  a lo largo de la curva dosis respuesta comparados con el grupo control. + $P < 0.05$  a lo largo de la curva dosis-respuesta comparados con sus respectivos grupos sin tratar.

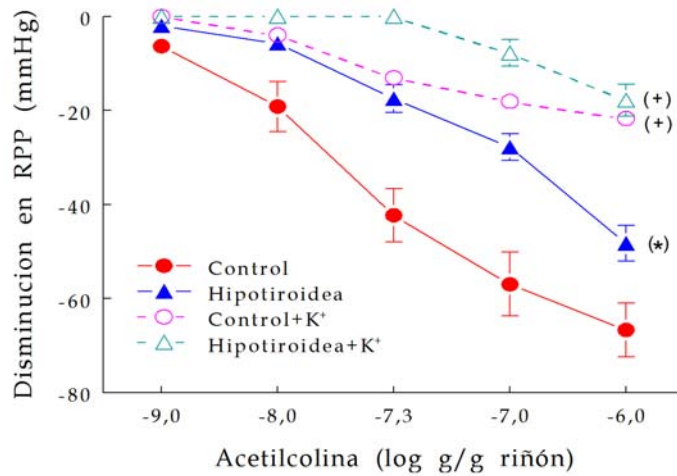


**Figura 7:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de nitroprusiato (NP) en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipotiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe+L-NAME ( $10^{-4}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \* $P < 0.05$  comparados con el grupo control. + $P < 0.05$  a lo largo de la curva dosis-respuesta comparados con sus respectivos grupos sin tratar.

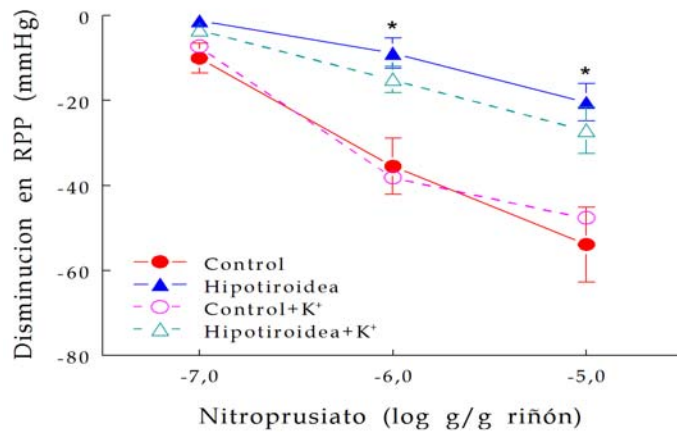


**Figura 8:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de papaverina (PV) en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipotiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe+L-NAME ( $10^{-4}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar.

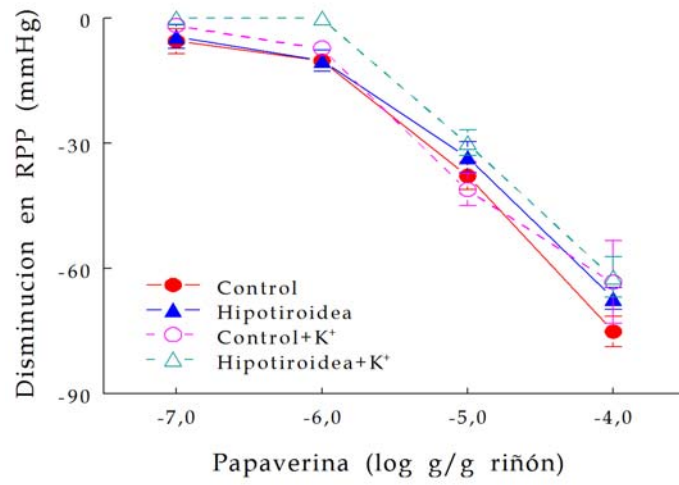
Cuando la preparación fue perfundida con una alta concentración de potasio (80 mM), la curva dosis-respuesta a ACh fue atenuada en ambos grupos, con resultados similares a los obtenidos después de la administración de L-NAME (Fig. 9). La curva dosis-respuesta a NPS no se afectó en las ratas controles e hipotiroideas (Fig. 10). La curva dosis-respuesta a PV no se modificó significativamente por el aumento de la concentración de  $K^+$  en los riñones controles e hipotiroideos (Fig. 11).



**Figura 9:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de ACh en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipotiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe (10<sup>-6</sup> M), o con Phe+80 mM KCl. Los datos son medias ± error estándar. \*P<0.05 a lo largo de la curva dosis respuesta comparados con el grupo control. +P<0.05 a lo largo de la curva dosis-respuesta comparados con sus respectivos grupos sin tratar.



**Figura 10:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de NP en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipotiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe (10<sup>-6</sup> M), o con Phe+80 mM KCl. Los datos son medias ± error estándar. \*P<0.05 comparados con el grupo control.



**Figura 11:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de PV en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipotiroideas (n=7 en cada grupo), precontractadas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe+80 mM KCl. Los datos son medias  $\pm$  error estándar.

## **2.2. EXPERIMENTO 2: Efecto del bloqueo del NO o FHDE en la respuesta renal a vasoconstrictores y vasodilatadores en riñones de ratas control e hipertiroideas.**

### **2.2.1. Variables biológicas**

Los efectos de la administración de tiroxina en las variables biológicas están representados en la tabla 4. Los animales tratados con T<sub>4</sub> durante 6 semanas ganaron significativamente menos peso que sus controles durante este periodo. Presión arterial media (PAM), presión de pulso (PP), frecuencia cardiaca (FC), peso del riñón (PR), peso ventricular total (PV), y niveles de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en suero aumentaron en ratas hipertiroideas. El peso tiroideo (PT) disminuyó en ratas hipertiroideas. Por consiguiente, las ratas tratadas con tiroxina durante 6 semanas desarrollaron las manifestaciones características del estado hipertiroideo.

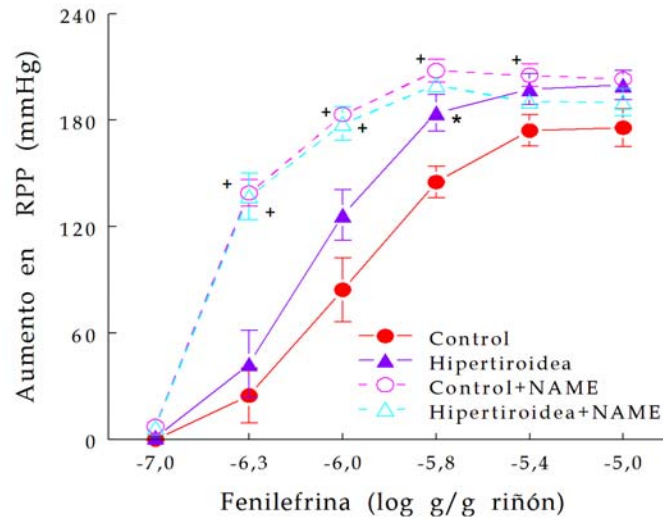
### **2.2.2. Respuesta a vasoconstrictores**

Los riñones procedentes de las ratas hipertiroideas presentaron un aumento de reactividad vascular a Phe respecto a las ratas controles consistente en un desplazamiento no paralelo hacia la izquierda, siendo las diferencias mayores a medida que aumenta la dosis, lo que determina un marcado incremento de la respuesta máxima (Fig. 12 y tabla 5).

La administración de L-NAME, el inhibidor competitivo de la síntesis de NO, produjo un marcado desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta a fenilefrina tanto en los riñones controles como hipertiroideos, siendo este desplazamiento mas marcado en las dosis bajas y medias de la curva, sin modificar la respuesta máxima. Tras la administración de L-NAME

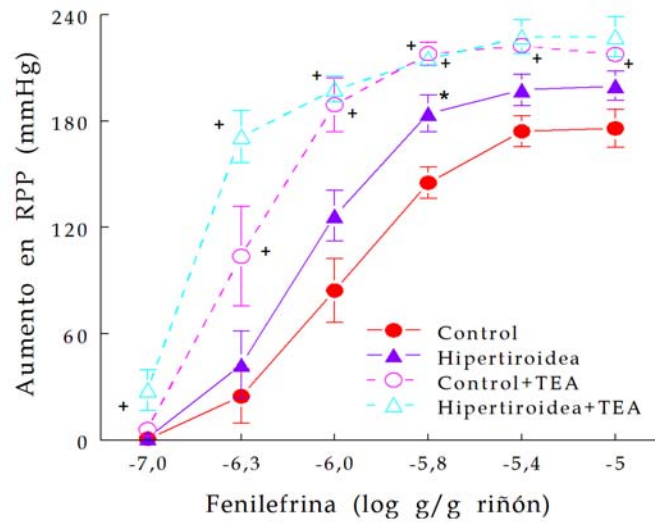


desaparecen las diferencias entre riñones hipertiroideos y controles (Fig. 12 y tabla 5).



**Figura 12:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados de ratas controles e hipertiroideas (n=7 en cada grupo) en condiciones normales y después de administrar L-NAME ( $10^{-4}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*P<0.05 comparados con el grupo control. +P<0.05 comparados con sus respectivos grupos sin tratar.

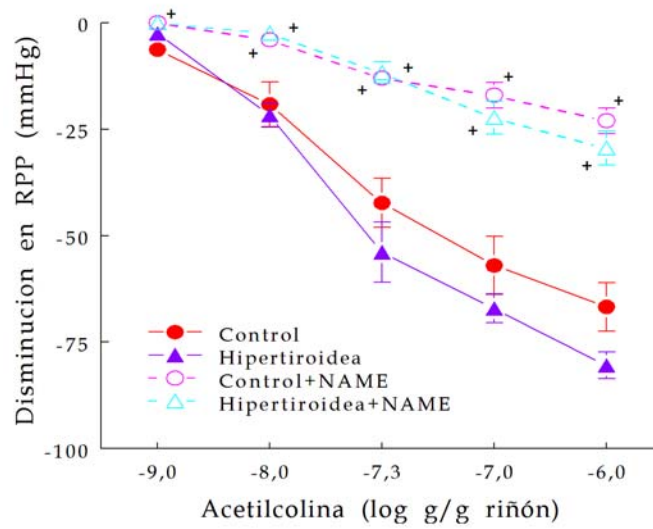
Un marcado incremento en la reactividad a Phe también se obtuvo cuando se administró TEA, el inhibidor de las canales de  $K^+$  y presuntamente inhibidor del FHDE. El TEA produjo un desplazamiento paralelo a la izquierda de la curva dosis respuesta tanto en los riñones controles como hipertiroideos, desapareciendo las diferencias entre ambos (Fig. 13 y tabla 5).



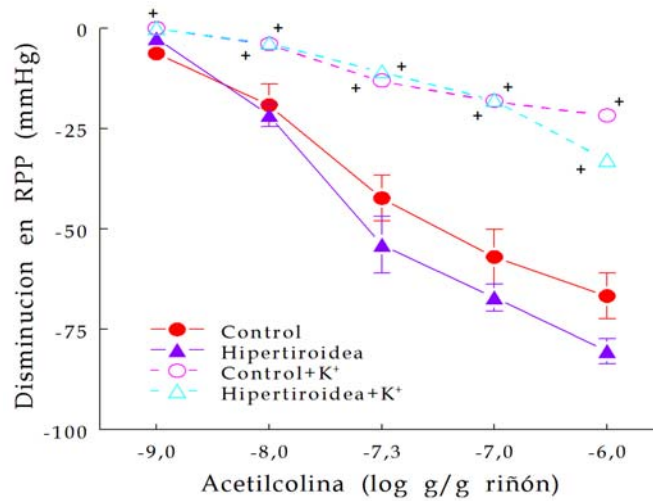
**Figura 13:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados de ratas controles e hipertiroideas (n=7 en cada grupo) en condiciones normales y después de administrar TEA ( $3 \times 10^{-3} M$ ). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \* $P < 0.05$  comparados con el grupo control. + $P < 0.05$  comparados con su respectivo grupo sin tratar.

### 2.2.3. Respuesta a vasodilatadores

La administración de ACh en riñones precontractados con Phe produjo una respuesta vasodilatadora dosis creciente que fue significativamente mayor en las dosis intermedias y altas en los riñones procedentes de las ratas hipertiroideas (Fig. 14 y tabla 5). Tras el bloqueo del NO mediante la administración de L-NAME en los riñones en los que se elevó el tono con Phe y tras el bloqueo del FHDE en los riñones que se utilizó un aumento de  $K^+$  (80 mM) extracelular para elevar el tono se produjo un marcado descenso en la respuesta a ACh, haciendo desaparecer la diferencia entre ambos grupos experimentales, excepto los tratados con elevado  $K^+$  que mostraron diferencias en el último punto de la curva (Fig. 15 y tabla 5).

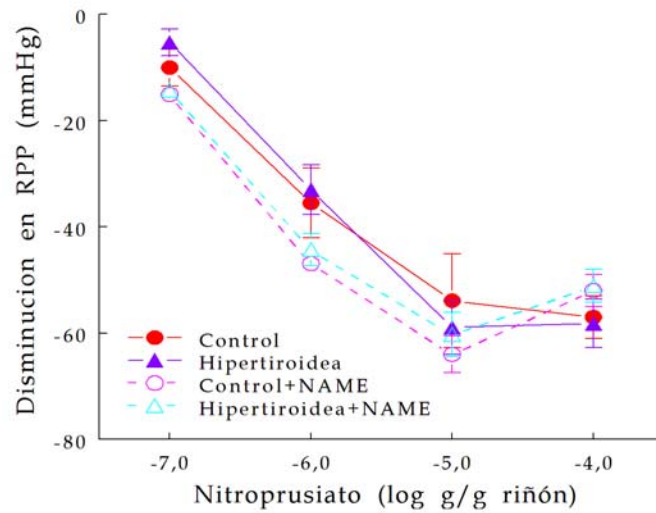


**Figura 14:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de ACh en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipertiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe+L-NAME ( $10^{-4}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar. +P<0.05 a lo largo de la curva dosis-respuesta comparados con sus respectivos grupos sin tratar.



**Figura 15:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de ACh en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipertiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe + 80 mM KCl. Los datos son medias  $\pm$  error estándar. +P<0.05 a lo largo de la curva dosis-respuesta comparados con sus respectivos grupos sin tratar.

La respuesta a NPS fue similar en riñones controles e hipertiroideos y fue incrementada de forma similar en ambos grupos experimentales tras la administración de L-NAME (Fig. 16 y tabla 5).

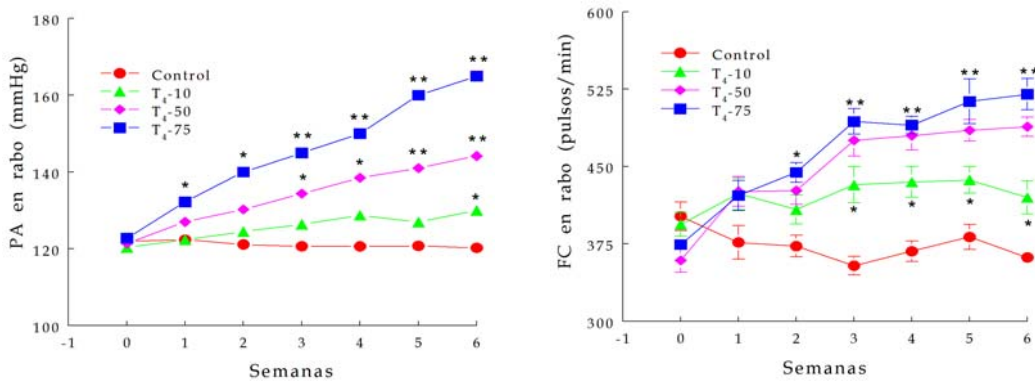


**Figura 16:** Curva dosis-respuesta al incrementar la dosis de NPS en riñones perfundidos aislados de ratas control e hipertiroideas (n=7 en cada grupo), preconstrañidas con Phe ( $10^{-6}$  M), o con Phe+L-NAME ( $10^{-4}$  M). Los datos son medias  $\pm$  error estándar.

### 2.3. EXPERIMENTO 3. Efecto del incremento de la dosis de T<sub>4</sub> en las enzimas antioxidantes y el estado de estrés oxidativo en estos animales.

#### 2.3.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca

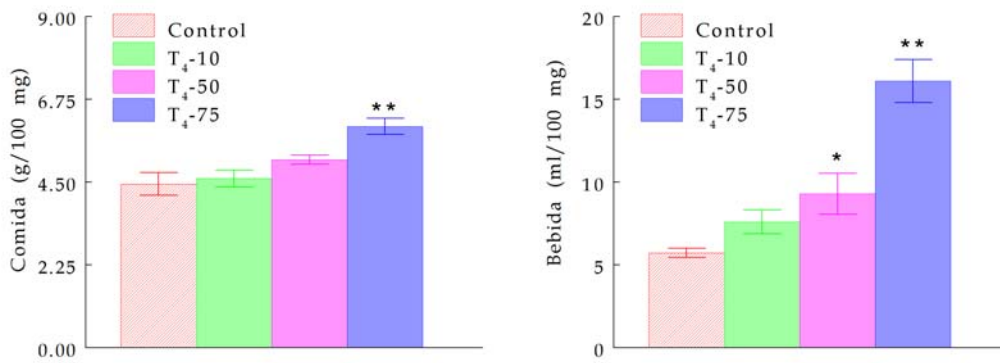
La administración de T<sub>4</sub> produjo un aumento de la presión arterial y frecuencia cardiaca a medida que incrementó la dosis de tiroxina (Fig. 17).



**Figura 17:** Evolución de la presión arterial (A) y frecuencia cardiaca (B) medidas en rabo por pletismografía en ratas control y tratadas con tiroxina a dosis de 10 (T<sub>4</sub>-10), 50 (T<sub>4</sub>-50) y 75 (T<sub>4</sub>-75) µg/rata/día. n=8 en cada grupo. Los datos son medias ± error estándar. \* p<0.01; \*\* p<0.001 comparados con el grupo control.

#### 2.3.2. Variables metabólicas

Se observó un incremento significativo en la ingesta de comida en el grupo T<sub>4</sub>-75, mientras que la ingesta hídrica aumentó en los grupos tratados con T<sub>4</sub> a medida que se incrementó la dosis de tiroxina (Fig. 18).



**Figura 18.** Ingesta de comida (A) expresada en g/100 mg de peso de rata e ingesta hídrica (B) expresada en ml/100 mg de peso de rata de los grupos control, 10 (T<sub>4</sub>-10), 50 (T<sub>4</sub>-50) y 75 (T<sub>4</sub>-75) µg/rata/día. n=8 en cada grupo. Los datos son medias ± error estándar. \* p<0.05; \*\* p<0.01 comparados con el grupo control.

### 2.3.3. Variables morfológicas

Hubo una disminución del peso corporal ganado ( $\Delta$ PC) y peso corporal final (PCF) en los grupos tratados con T<sub>4</sub>, a medida que aumentó la dosis de tiroxina (Tabla 6).

El peso absoluto del riñón no fue diferente significativamente en los grupos experimentales comparados con el grupo control (Tabla 6). Un aumento del peso relativo del riñón alcanzó significación a las dosis de 50 y 75 µg/rata/día (Tabla 7).

El peso absoluto del ventrículo izquierdo fue similar en todos los grupos (Tabla 6). El peso absoluto del ventrículo derecho aumentó significativamente en las ratas tratadas con T<sub>4</sub> (Tabla 6).

Se observó un aumento de la hipertrofia ventricular relativa izquierda y derecha en los grupos T<sub>4</sub>. La tasa VI/VD descendió en todos los grupos tratados con T<sub>4</sub> (Tabla 7).

#### **2.3.4. Variables plasmáticas**

No hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de sodio y potasio entre los diferentes grupos (Tabla 8).

Los niveles de creatinina aumentaron significativamente en el grupo tratado con 75 µg/rata/día de tiroxina (Tabla 9). Los niveles de proteínas plasmáticas estaban reducidas en el grupo T<sub>4</sub>-75 (Tabla 9).

La administración de T<sub>4</sub> produjo un aumento significativo del MDA plasmático en los grupos T<sub>4</sub>-50 y T<sub>4</sub>-75 (Tabla 9).

#### **2.3.5. Variables urinarias**

La diuresis, y la excreción total de sodio y potasio aumentaron en el grupo T<sub>4</sub>-75 (Tabla 10), en consonancia con la mayor ingesta de comida y bebida de este grupo.

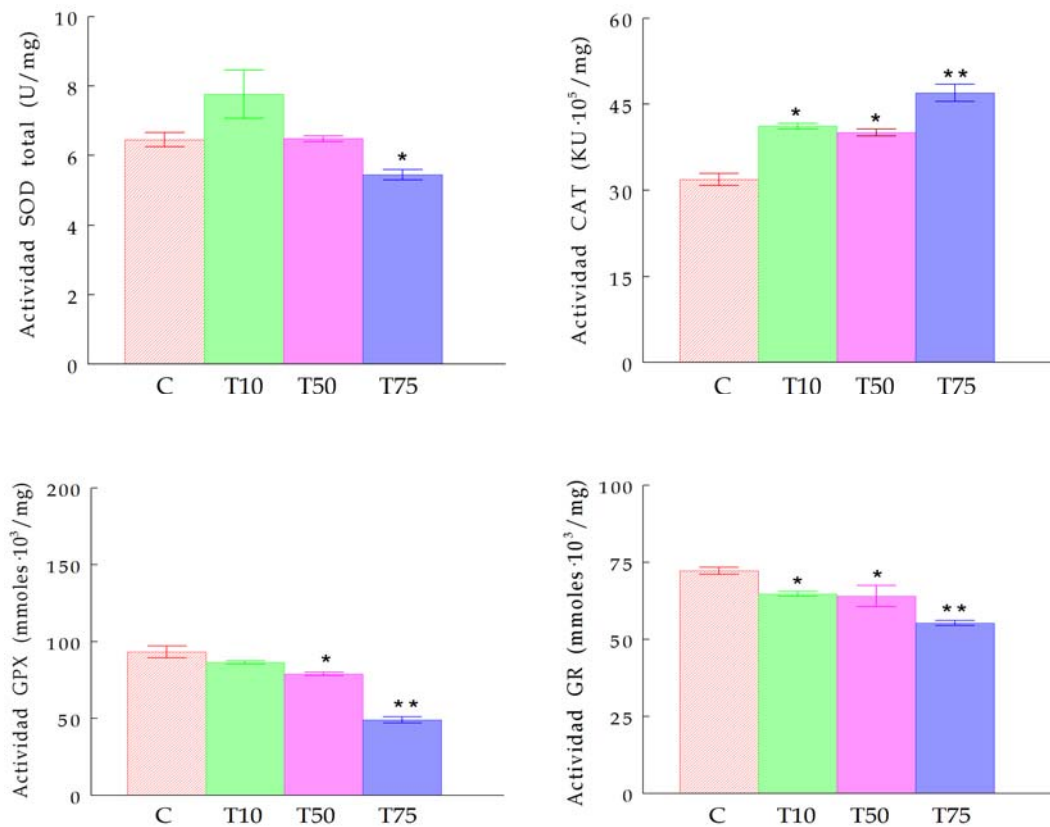
Se observó un incremento de la proteinuria en los grupos tratados con T<sub>4</sub> a medida que aumentó la dosis de tiroxina (Tabla 11), alcanzando significación en las dosis de 50 y 75 µg/rata/día, y el aclaramiento de creatinina se redujo significativamente en el grupo T<sub>4</sub>-75 (Tabla 11).

La administración de T<sub>4</sub> produjo un incremento de los niveles de isoprostanos-F<sub>2</sub> urinarios (Tabla 11).

### 2.3.6. Actividad de enzimas antioxidantes

- **Actividad enzimática de la corteza renal**

La actividad total SOD se redujo significativamente en el grupo T<sub>4</sub>-75. Hubo un incremento de la actividad catalasa, y un descenso de las actividades GPX y GR en los grupos T<sub>4</sub> tratados a medida que la dosis de tiroxina aumentó (Fig. 19).

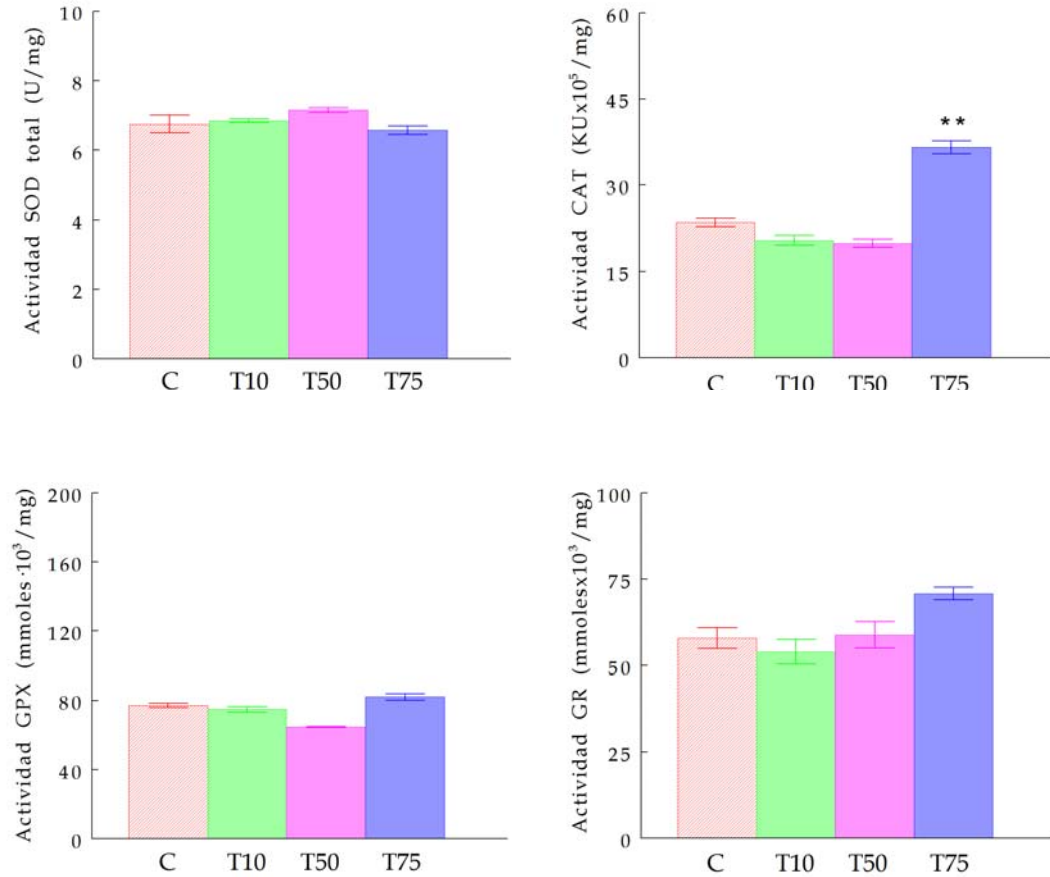


**Figura 19.** Actividad superóxido dismutasa total (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), y glutatión reductasa (GR) en corteza renal de los grupos control (C), 10 (T10), 50 (T50) y 75 (T75) µg/rata/día. n=8 en cada grupo. Los datos son medias ± error estándar. \* p<0.05; \*\* p<0.01 comparados con el grupo control.



- **Actividad enzimática de la médula**

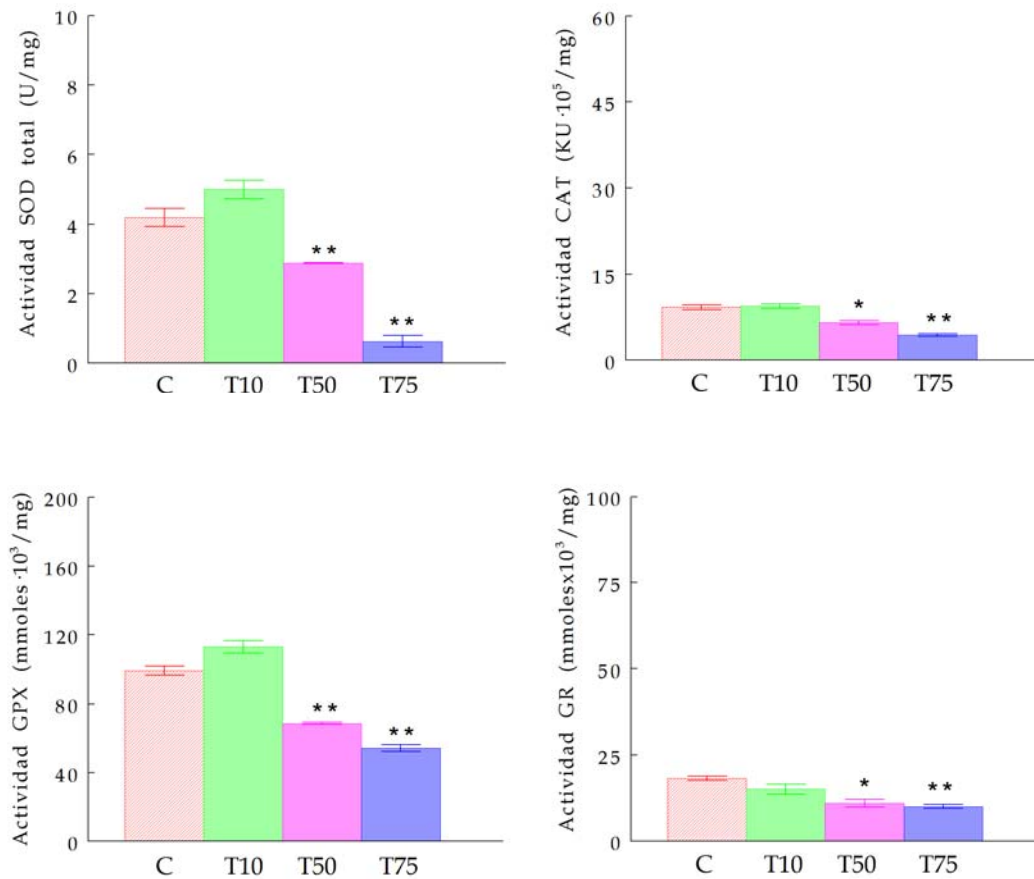
En la médula renal se observó un incremento significativo de la actividad catalasa en el grupo T<sub>4</sub>-75, no encontrando diferencias significativas en el resto de actividades enzimáticas (Fig. 20).



**Figura 20.** Actividad superóxido dismutasa total (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), y glutatión reductasa (GR) en médula renal de los grupos control (C), 10 (T10), 50 (T50) y 75 (T75)  $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ .  $n=8$  en cada grupo. Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*\*  $p<0.01$  comparados con el grupo control.

- **Actividad enzimática del ventrículo izquierdo**

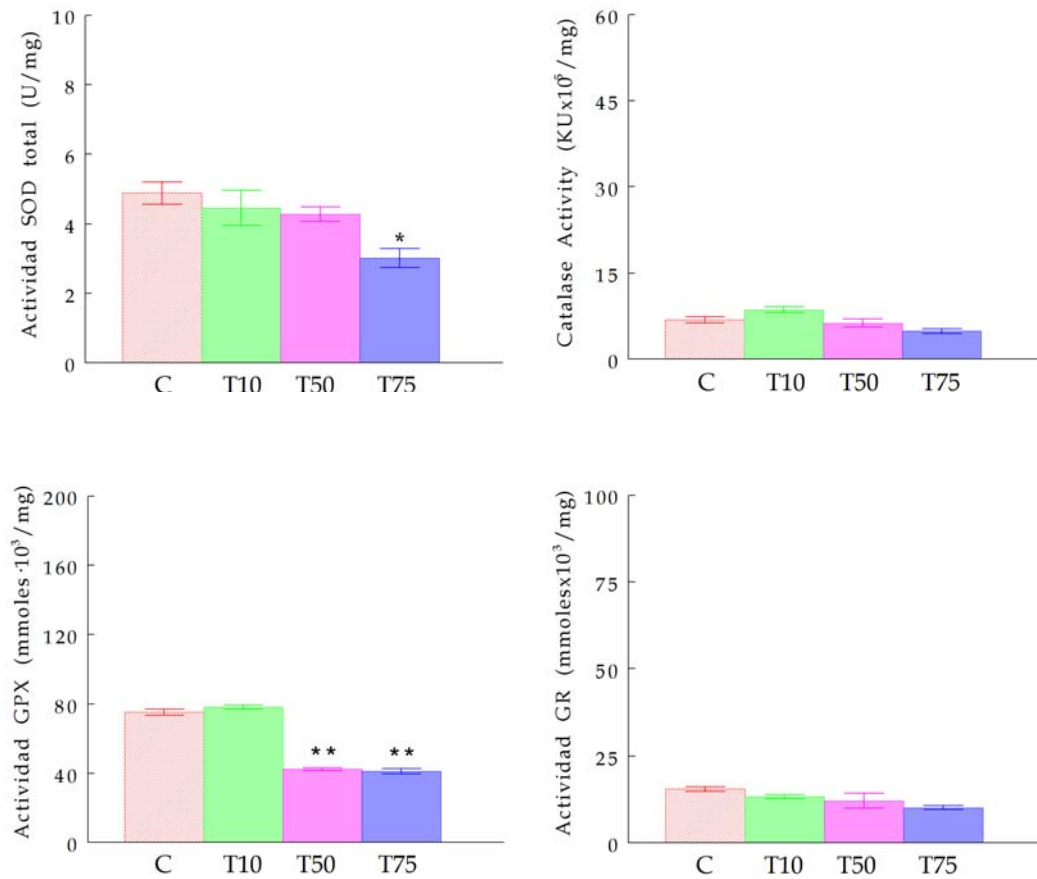
En el ventrículo izquierdo, se observaron reducciones significativas en todas las enzimas antioxidantes en los grupos T<sub>4</sub>-50 y T<sub>4</sub>-75 a medida que la aumentó la dosis de tiroxina (Fig. 21).



**Figura 21.** Actividad superóxido dismutasa total (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), y glutatión reductasa (GR) en ventrículo izquierdo de los grupos control (C), 10 (T10), 50 (T50) y 75 (T75)  $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ .  $n=8$  en cada grupo. Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$  comparados con el grupo control.

- **Actividad enzimática del ventrículo derecho**

Una tendencia similar fue observada en el ventrículo derecho, pero solo se alcanzaron significaciones en el grupo T<sub>4-75</sub> (Fig. 22), excepto para la actividad catalasa.

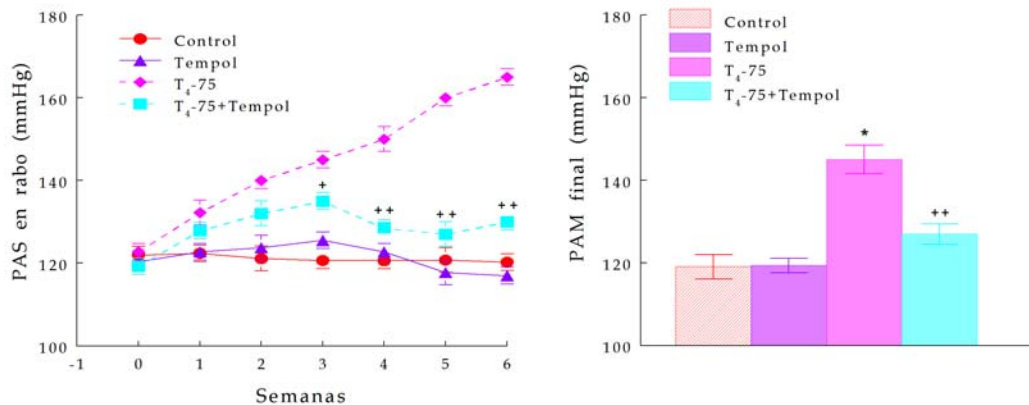


**Figura 22.** Actividad superóxido dismutasa total (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), y glutatión reductasa (GR) en ventrículo derecho de los grupos control (C), 10 (T10), 50 (T50) y 75 (T75)  $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ . n=8 en cada grupo. Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \* p<0.05; \*\* p<0.01 comparados con el grupo control.

## 2.4. EXPERIMENTO 4. Efecto antioxidante del Tempol en las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo.

### 2.4.1. Presión arterial sistólica y presión arterial media

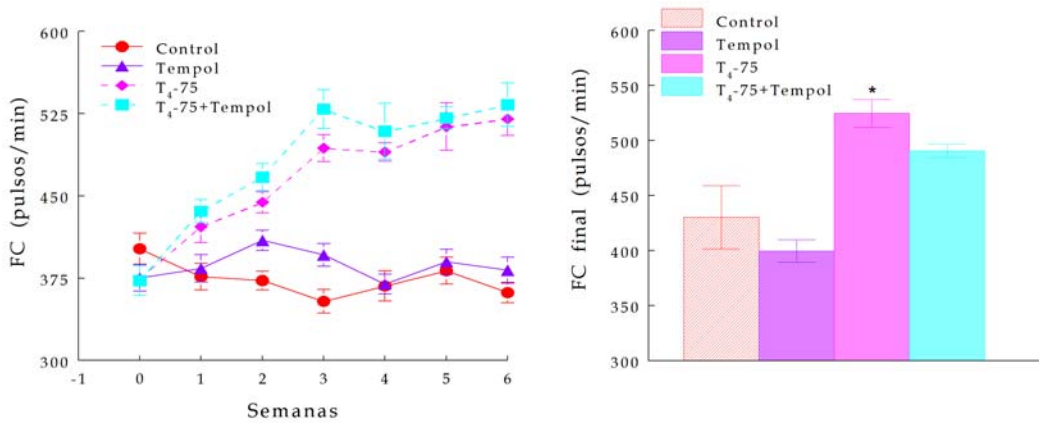
La administración de tiroxina a dosis de 75  $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$  indujo un incremento de la presión sanguínea en rabo (Fig. 23) a lo largo del periodo experimental, que fue significativamente atenuado por la co-administración de Tempol. La presión sanguínea medida en el rabo de la rata fue significativamente menor en ratas  $T_4$ +Tempol en las cuatro últimas medidas del estudio cuando se comparan con el grupo  $T_4$ . La administración de Tempol en ratas normales no produjo cambios significativos en la presión sanguínea. Las medidas de presión arterial realizadas por registro directo en ratas conscientes al final del experimento confirmaron los valores obtenidos por el método indirecto.



**Figura 23.** (A) Evolución de la presión arterial medida a lo largo del periodo experimental por pletismografía en ratas conscientes y (B) presión arterial media (PAM) medida por registro directo en ratas conscientes.  $n=8$  en cada grupo. Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*  $p<0.01$  comparados con el grupo control. +  $p<0.05$ ; ++  $p<0.01$  comparados con el grupo  $T_4$ -75.

### 2.4.2 Frecuencia cardiaca

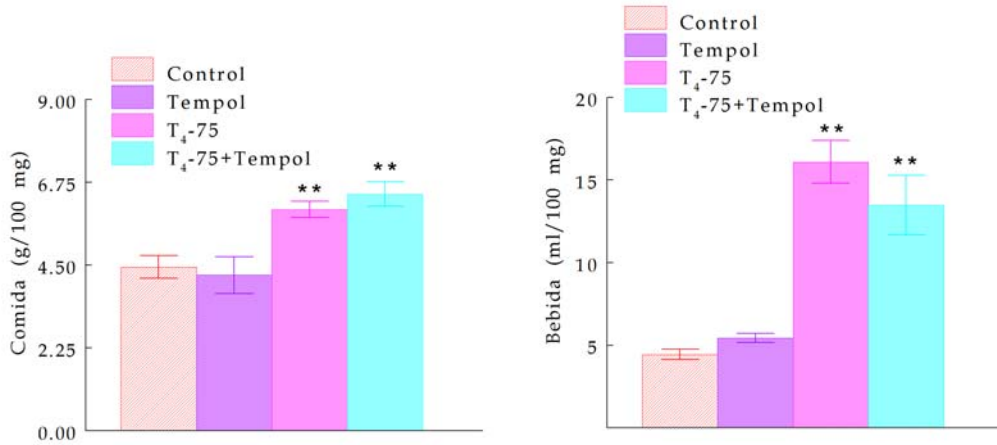
La medida de la frecuencia cardiaca por pletismografía o al final del estudio por registro directo mostró que esta variable no se afectó significativamente por el tratamiento con Tempol en ratas normales o tratadas con  $T_4$  (Fig. 24).



**Figura 24.** (A) Evolución de la frecuencia cardiaca en rabo medida por pletismografía en ratas conscientes durante el periodo experimental y (B) frecuencia cardiaca final medido por registro directo en ratas conscientes. n=8 en cada grupo. Los datos son medias  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.01$  comparados con el grupo control.

### 2.4.3. Variables metabólicas

Se observó un incremento significativo en la ingesta de comida e ingesta hídrica en los grupos tratados con  $T_4$ . El tratamiento con Tempol no afectó a la ingesta hídrica en controles o en el grupo tratado con  $T_4$  (Fig. 25).



**Figura 25.** Ingesta de comida (A) expresada en g/100 mg de peso de rata e ingesta hídrica (B) expresada en ml/100 mg de peso de rata de los grupos control, Tempol, T<sub>4</sub>-75 (75 µg/rata/día) y T<sub>4</sub>-75+Tempol. n=8 en cada grupo. Los datos son medias ± error estándar. \*\* p<0.01 comparados con el grupo control.

#### 2.4.4. Variables morfológicas

En los grupos tratados con T<sub>4</sub>, el peso corporal ganado ( $\Delta$ PC) y el peso corporal final (PCF) disminuyó (Tabla 12). El Tempol no modificó significativamente el PC en los controles o en las ratas tratadas con T<sub>4</sub> (Tabla 12).

El peso absoluto del riñón no cambió significativamente en los grupos experimentales comparados con el grupo control (Tabla 12). Se observó un aumento significativo del peso relativo del riñón en los grupos tratados con tiroxina (Tabla 13).

El peso absoluto del ventrículo izquierdo fue similar en todos los grupos (Tabla 12), salvo en el grupo T<sub>4</sub>+Tempol, que aumentó. El peso absoluto del ventrículo derecho incrementó significativamente en las ratas tratadas con T<sub>4</sub> (Tabla 12).

Se observó un aumento de la hipertrofia ventricular relativa izquierda y derecha en los grupos tratados con T<sub>4</sub>. La tasa VI/VD descendió en todos los grupos tratados con T<sub>4</sub> (Tabla 13).

El Tempol no modificó los pesos relativos del riñón y corazón en ratas controles y tratadas con T<sub>4</sub> (Tabla 13).

#### **2.4.5. Variables plasmáticas**

No hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de sodio y potasio entre los diferentes grupos (Tabla 14).

Los niveles de creatinina aumentaron y los niveles de proteínas disminuyeron significativamente en los grupos tratados con tiroxina (Tabla 15). Los niveles de creatinina y proteínas no se vieron afectados por el tratamiento con Tempol.

La administración de T<sub>4</sub> produjo un aumento significativo de los niveles de MDA plasmático en el grupo T<sub>4</sub> (Tabla 15), pero no incrementó en el grupo T<sub>4</sub>+Tempol. El Tempol no modificó los valores de malondialdehído en ratas controles (Tabla 15).

#### **2.4.6. Variables urinarias**

La diuresis, y la excreción total de sodio y potasio aumentaron en los grupos tratados con T<sub>4</sub> (Tabla 16), en consonancia con la mayor ingesta de comida y bebida de estos grupos.

Se observaron incrementos y disminuciones significativas de la proteinuria y del aclaramiento de creatinina, respectivamente, en los grupos tratados con T<sub>4</sub> (Tabla 17).

El Tempol no modificó significativamente ninguna de estas variables renales en las ratas controles y tratadas con T<sub>4</sub> (Tabla 16 y tabla 17).

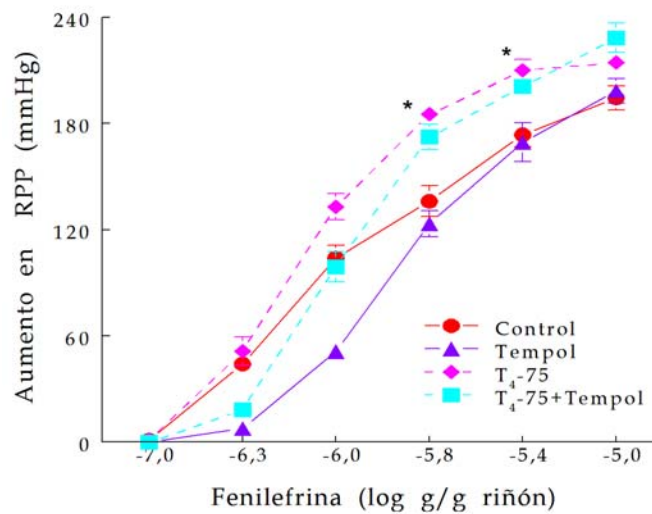
Se observó un incremento de los niveles de isoprostanos-F<sub>2</sub> urinarios en el grupo T<sub>4</sub>, no aumentando en el grupo T<sub>4</sub>-Tempol (Tabla 17). El Tempol no modificó la excreción de isoprostanos F<sub>2</sub> en las ratas normales.



## 2.5. EXPERIMENTO 5. Efecto del Tempol en la respuesta renal a vasoconstrictores.

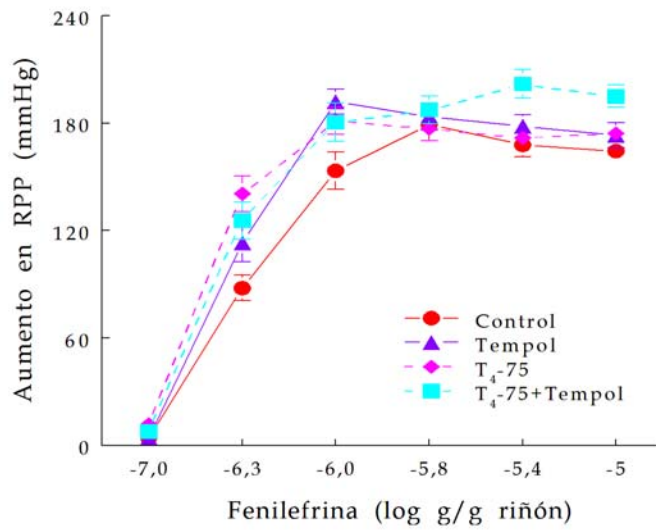
### 2.5.1. Respuesta a fenilefrina

La administración crónica de Tempol produjo una atenuación de la curva dosis respuesta a Phe en riñones controles e hipertiroideos. Esta reducción afectó a las dosis bajas determinando una reducción de sensibilidad sin afectar a la respuesta máxima en ambos grupos experimentales (Fig. 26).



**Figura 26:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados de los diferentes grupos experimentales: Control, Tempol, T<sub>4</sub>-75 y T<sub>4</sub>-75+Tempol. (n=8 en cada grupo). Los datos son medias ± error estándar. \*P<0.05 comparados con el grupo control.

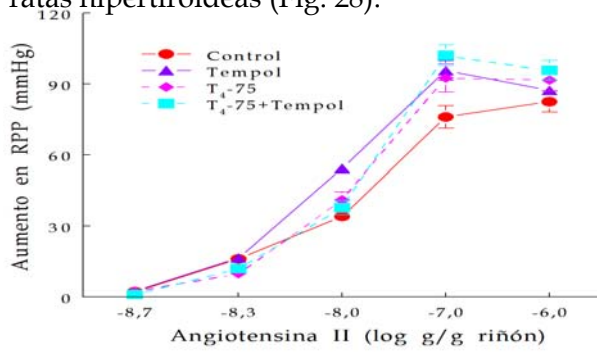
Los cambios de reactividad a Phe inducidos por el Tempol fueron suprimidos cuando la curva se realizó en riñones sin endotelio en los que se observó un marcado desplazamiento a la izquierda de la curva, observándose además una mayor respuesta en los riñones hipertiroideos en las dosis más bajas (Fig. 27).



**Figura 27:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados sin endotelio de los diferentes grupos experimentales: Control, Tempol, T<sub>4</sub>-75 y T<sub>4</sub>-75+Tempol. (n=8 en cada grupo). Los datos son medias ± error estándar.

- **Respuesta a angiotensina II**

La curva dosis respuesta a Ang II no fue atenuada por la administración de Tempol ni en los riñones de las ratas normales ni en los procedentes de las ratas hipertiroideas (Fig. 28).



**Figura 28:** Curva dosis-respuesta a Phe en riñones aislados de los diferentes grupos experimentales: Control, Tempol, T<sub>4</sub>-75 y T<sub>4</sub>-75+Tempol. (n=8 en cada grupo). Los datos son medias ± error estándar.

## *V. DISCUSIÓN*



### **1. Reactividad vascular en el hipotiroidismo**

Ratas tratadas con MTZ durante 6 semanas desarrollaron las manifestaciones características del estado hipotiroideo, y estas se acompañaron de una anormal reactividad vascular a VC y VD en riñones aislados. La curva dosis-respuesta a Phe, en riñones aislados de ratas hipotiroideas, fue reducida respecto a las ratas controles, sin embargo, se observó una reactividad normal a Ang II en los riñones hipotiroideos. Estos riñones también mostraron una atenuada reactividad a ACh y NPS con una reactividad normal a PV. El objetivo de este estudio fue determinar si el NO y FHDE están involucrados en estas anomalías de reactividad vascular renal de las ratas hipotiroideas.

- **Vasoconstrictores**

La reactividad vascular a Phe y a otros agonistas  $\alpha_1$ -adrenorreceptores se ha encontrado disminuida en diversas preparaciones de animales hipotiroideos (Brown y Pollock, 1980; Grieve y cols., 1990; Rahmani y cols., 1987; Sabio y cols., 1994). El efecto inhibitorio del hipotiroidismo sobre la vasoconstricción inducida por Phe se restauró mediante terapia sustitutiva con T<sub>4</sub> (Grieve y cols., 1990; Larsen y cols., 1998), sugiriendo que las acciones de las drogas antitiroideas sobre la reactividad vascular son dependientes de la inducción del estado hipotiroideo y no se deben a la acción directa de estas drogas o a otros factores no relacionados con la acción antitiroidea.

La ausencia de endotelio inducida por destrucción mecánica aumenta la reactividad a los VC en el riñón aislado (Ercan y cols., 1999; Vargas y Osuna, 1996), igualmente la administración de L-NAME o TEA, inhibidores respectivamente del NO y FHDE, también producen un aumento de reactividad a VC (Vargas y Osuna, 1996), indicando que el NO y el FHDE

modulan la respuesta a VC en el riñón aislado y perfundido. Tras el bloqueo del NO, la respuesta presora a Phe se incrementó en los riñones controles e hipotiroideos, pero las diferencias entre los grupos se mantuvieron después de la administración de L-NAME. Por consiguiente, estos resultados sugieren que la hiporespuesta a Phe observada tras la administración oral de MTZ no se debe a un aumento de la producción de NO por el endotelio, al menos en el lecho vascular renal. Esta observación se sostiene por la capacidad del MTZ de atenuar la respuesta presora al bloqueo agudo de la síntesis de NO y por la capacidad de prevenir la hipertensión L-NAME (Vargas y cols., 1996), indicando que el hipotiroidismo atenúa la respuesta presora a VC por una vía NO-independiente.

Una importante pero no perfectamente aclarada asociación entre el sistema nervioso adrenérgico y la anomalía de la función tiroidea se han puesto en evidencia en muchas circunstancias (Larsen y cols., 1998), aunque una asociación entre esta enfermedad y la concentración de  $\alpha_1$ -adrenorreceptores no ha sido establecida. Por consiguiente, el descenso de sensibilidad a la Phe observado en los riñones aislados de animales tratados con metimazol puede ser explicado por una reducción en el número de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentes en el músculo liso vascular o por cambios en su eficiencia de acoplamiento. Sin embargo, aunque se ha establecido que el hipotiroidismo puede modular el número de  $\alpha$ -adrenorreceptores presentes en el tejido cardíaco (Zwaveling y cols., 1996) y adiposo (Dicker y cols., 1992), no hay, por el momento, evidencias directas para sugerir que este fenómeno tenga un efecto similar sobre la densidad de los  $\alpha_1$ -adrenorreceptores vasculares. Además, el hipotiroidismo provoca una respuesta anómala del propio músculo liso vascular como indica la reducción de la respuesta a cloruro de bario en los

riñones obtenidos de las ratas tratadas con metimazol (Sabio y cols., 1994; Vargas y cols., 1996).

La respuesta vascular renal a Ang II era normal en riñones de las ratas hipotiroideas, aunque no fue modificada por los bloqueadores de los factores relajantes endoteliales o por la retirada del endotelio. Es bien conocido, que la Ang II modula la producción de NO en muchas preparaciones (Millat y cols., 1999). El desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta a Ang II producido por el inhibidor del NO en preparaciones controles (ver figura 2) indica que el NO contrarresta el efecto presor de la Ang II en el riñón aislado y perfundido de rata. La incapacidad del L-NAME para modificar la curva dosis-respuesta a Ang II en las preparaciones hipotiroideas indica una reducida liberación de NO inducida por Ang II en riñones hipotiroideos. Esta observación está en consonancia con la reducida reactividad de los riñones hipotiroideos a ACh (ver figura 6), un vasodilatador endotelio-dependiente que dispara la liberación de NO (Furchgott y Vanhoutte, 1989). Además, la inesperada respuesta normal a Ang II en riñones hipotiroideos puede ser el resultado de una reducida respuesta a NO, como indica la atenuada respuesta al donante de NO, NPS, (Ignarro y cols., 1989), el cual podría no contrarregular la respuesta presora a Ang II. Sin embargo, se requiere más experimentos para determinar la causa de esta anómala interacción Ang II-NO en la vasculatura del riñón hipotiroideo.

La reactividad vascular a VC es modulada por los canales de K<sup>+</sup>. Así, las drogas que abren los canales de K<sup>+</sup> inhiben los leucotrienos C4 y D4 o la vasoconstricción inducida por Ang II (Ignarro y cols., 1981; McLeod y Piper, 1992) y el TEA induce un aumento dosis-dependiente en la sensibilidad vascular a norepinefrina y Ang II (Sabineau y Marthan, 1993). Sin embargo, ha sido postulado que, bajo condiciones fisiológicas normales, la probabilidad de

que los canales de  $K^+$  se encuentren abiertos es muy bajo, ya que la concentración intracelular de ATP puede ser bloqueada por el fosfato de creatinina a un nivel por encima del requerido para cerrar los canales (Davies, 1990). El hecho de que la administración de TEA produzca un aumento en la respuesta a VC indica que algunos de los canales de  $K^+$  estaban abiertos debido a la liberación del FHDE, porque el TEA fue incapaz de modificar la reactividad a VC en las preparaciones que se les había eliminado el endotelio. Estas observaciones confirman los hallazgos previos por nuestro grupo (Vargas y Osuna, 1996), indicando que el FHDE presente en la vasculatura está implicado como modulador de la respuesta renal a VC en el riñón aislado y perfundido de rata.

La administración de TEA fue incapaz de modificar significativamente la respuesta presora a Phe o a Ang II en los riñones de las ratas hipotiroideas. Esta alteración puede ser producida por una disminuida producción del FHDE en la respuesta a la administración de VC, o, alternativamente, el hipotiroidismo puede determinar que permanezcan cerrados un mayor número de canales de  $K^+$ , como una respuesta compensadora al alterado sistema contráctil del músculo liso vascular de ratas hipotiroideas (Sabio y cols., 1994). El presente estudio es, a nuestro entender, el primer trabajo que investiga la acción del hipotiroidismo en los canales de  $K^+$  vasculares, requiriéndose estudios adicionales para determinar el mecanismo responsable de las alteraciones observadas.

- **Vasodilatadores**

Los riñones de las ratas hipotiroideas muestran una reducción en la respuesta vasodilatadora a ACh y a NPS, en consonancia con observaciones



previas de nuestro grupo (Vargas y cols., 1995), pero la respuesta a PV no fue afectada, de acuerdo con los hallazgos de Takiguchi y colaboradores (Takiguchi y cols., 1988) en la vasculatura mesentérica. Además, el bloqueo del NO o FHDE inducido por la administración de L-NAME o elevación de  $K^+$  extracelular, respectivamente, produce una inhibición adecuada de la vasodilatación inducida por ACh. Todos estos resultados indican que, en las preparaciones hipotiroideas, los dos componentes endoteliales de la vasodilatación inducida por ACh en el lecho vascular renal, es decir, NO y FHDE (Vargas y cols., 1994), están presentes pero tienen una reactividad reducida o hay una menor producción de los mismos. La reducción de reactividad al donante de NO está de acuerdo con esta observación. Sin embargo, la vasodilatación independiente al NO no resultó afectada en los riñones hipotiroideos. Además, la reducida actividad vascular del NO sintasa recientemente descrita en el tejido aórtico de ratas hipotiroideas (Quesada y cols., 2002) podría contribuir a la atenuada respuesta a ACh en las preparaciones hipotiroideas, reduciendo la cantidad total de NO endotelial producido.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que la atenuada respuesta renal presora a Phe en el estado hipotiroideo no se debe a un aumento de la actividad de los factores relajantes derivados del endotelio, NO y FHDE. Este estudio también muestra evidencias de anormalidades en la liberación del FHDE o en los canales de  $K^+$  en las preparaciones hipotiroideas, dado que la curva dosis-respuesta a VC no fue incrementada por la administración de TEA. Nuestros resultados también indican que las preparaciones hipotiroideas tienen una reactividad reducida al NPS, donante de NO, y que la vasodilatación NO-independiente no está alterada.

Anomalías en la liberación de los mediadores de la vasodilatación endotelio-dependiente juegan un papel importante en la génesis de las alteraciones vasculares que se producen en la hipertensión, arteriosclerosis o diabetes. En este estudio se ha analizado el papel de los factores relajantes endoteliales en las alteraciones de la reactividad vascular del hipotiroidismo. Los datos descritos aportan evidencias de que la atenuada reactividad a Phe en el estado hipotiroideo no es secundaria a un aumento en la producción y actividad en los factores relajantes derivados del endotelio, NO y FHDE. Este estudio, igualmente muestra que la respuesta a los vasoconstrictores en las preparaciones hipotiroideas es insensible a los canales de K<sup>+</sup>. Esta anomalía, junto con la reducida reactividad del NO, puede ser una respuesta compensadora a un alterado sistema contráctil del músculo liso vascular de las ratas hipotiroideas.

El presente estudio, a nuestro entender, es el primero que evalúa las acciones del hipotiroidismo sobre los canales de K<sup>+</sup> vasculares y por consiguiente abre nuevas perspectivas para el manejo de las anomalías vasculares de las alteraciones tiroideas.

## **2. Reactividad vascular en el hipertiroidismo**

- **Vasoconstrictores**

Los riñones procedentes de las ratas hipertiroideas presentaron un aumento de reactividad vascular a Phe respecto a las ratas controles sin cambios en la sensibilidad a la misma, que corresponden con una alteración estructural de hipertrofia vascular (Fig. 12). Estos resultados están en consonancia con los descritos en la vasculatura renal de ratas hipertiroideas en trabajos previos de nuestro laboratorio (Sabio y cols., 1994), aunque contrastan

con la respuesta normal descrita en el lecho vascular de cuartos traseros de perros y ratas hipertiroideos (Koehn y cols., 1967; Zsoter y cols., 1964; Van der Schoot y Moran, 1965). En arterias mesentéricas de ratas hipertiroideas también se han obtenido respuestas discrepantes, aportándose aumentos en la respuesta (Grassby y McNeill, 1988) y una reactividad normal (Ishac y Pennefather, 1983; Zwaveling y cols., 1996) a agentes  $\alpha_1$ -adrenérgicos. En resumen, como se describió en la introducción, estos datos indican que no hay una alteración generalizada en la respuesta a los agentes vasoconstrictores en las ratas hipertiroideas y que esta respuesta es tejido y tiempo dependiente.

- **Vasodilatadores**

Los riñones procedentes de las ratas hipertiroideas presentaron un aumento de reactividad a ACh. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por nuestro grupo en vasos de conducción y en la misma preparación en ratas hipertiroideas (Vargas y cols., 1995). Este incremento en la respuesta endotelio-dependiente en preparaciones de ratas hipertiroideas fue confirmado posteriormente por otros laboratorios (Büssemaker y cols., 2003; McAllister y cols., 1998; Iwata y Honda, 2004). Aunque, Lockette y colaboradores (1987), observaron que en aorta de ratas hipertiroideas la relajación es menor a ACh; al ionóforo del calcio, A23187; y al nitroprusiato sódico y que la sensibilidad al factor natriurético atrial y 8-Br cGMP estaba inalterada. El incremento de vasodilatación endotelio-dependiente usualmente observado en vasos de resistencia de ratas hipertiroideas concuerda con la reducida resistencia vascular característica de esta enfermedad y puede ser, en parte, debido al shear stress inducido en la pared vascular por el incremento del gasto cardíaco como se describirá a continuación.

**• Papel de los mediadores endoteliales en la respuesta a vasoconstrictores y vasodilatadores en los riñones de ratas hipertiroideas**

Como ya se ha comentado, el endotelio sirve como un sensor de presión y flujo, activando, ambos, la liberación de factores relajantes derivados del endotelio (Rubanyi y cols., 1990). Cuando se elimina el endotelio aumenta la sensibilidad a VC en el riñón aislado (Ercan y cols., 1990; Vargas y Osuna, 1996) y también aumenta la respuesta producida por la administración de L-NAME o TEA (Vargas y Osuna, 1996), indicando que el NO y el FHDE modulan la respuesta a VC en el riñón aislado perfundido. Por lo que una alteración en la liberación de mediadores endoteliales juega un importante papel en la génesis de las anomalías vasculares funcionales que aparecen en la hipertensión, arteriosclerosis o diabetes.

La administración de L-NAME, el inhibidor competitivo de la síntesis de NO, produjo un marcado incremento de sensibilidad a Phe tanto en los riñones controles como hipertiroideos. Tras la administración de L-NAME desaparecen las diferencias entre riñones hipertiroideos y controles (Fig. 12). Igualmente, también se obtuvo un marcado incremento en la sensibilidad a Phe cuando se administró TEA tanto en los riñones controles como hipertiroideos, desapareciendo las diferencias entre ambos (Fig. 13). Los riñones de ratas hipertiroideas presentaron un aumento de reactividad a ACh y tras el bloqueo del NO mediante la administración de L-NAME o tras la administración de K<sup>+</sup> extracelular (80 mM) se produjo una marcada atenuación de la respuesta tanto en los riñones normales como hipertiroideos, desapareciendo la diferencia entre ambos grupos experimentales. Estos resultados indican la participación de los mediadores endoteliales NO y FHDE en las anomalías de reactividad a los agentes vasoactivos en el hipertiroidismo. Otros autores también han

puesto de manifiesto la participación de ambos factores en las alteraciones de reactividad vascular en otras preparaciones de las ratas hipertiroideas. Así, McAllister y colaboradores (1998), observaron que las respuestas contráctiles a NE estaban reducidas en el estado hipertiroideo en presencia de un endotelio intacto, mientras que los anillos vasculares de ratas hiper y eutiroideas sin endotelio no mostraban diferencias significativas en las respuestas contráctiles a NE. Estos resultados sugieren que las respuestas reducidas a NE en vasos con el endotelio intacto son principalmente debidas a adaptaciones endoteliales inducidas por el hipertiroidismo. Resultados similares fueron obtenidos por Scivoletto y colaboradores (1986) en anillos aórticos de rata. Más recientemente, Büssemaker y colaboradores (2003), determinaron los efectos del hipertiroidismo agudo y crónico in vivo en la contribución del NO y FHDE en la relajación dependiente del endotelio en anillos de arteria renal y observaron que esta relajación aumentó entre las 36 h y 8 semanas de empezar el tratamiento con T<sub>3</sub>. En este periodo de tiempo, la relajación mediada por FHDE y por NO aumentó significativamente.

Estudios realizados en células endoteliales cultivadas (Noris y cols., 1995; Ranjan y cols, 1995; Uematsu y cols., 1995) y en vasos sanguíneos (Nodaud y cols., 1996) expuestos a un aumento de shear stress y flujo, respectivamente, mostraron un aumento en la vasodilatación endotelio-dependiente e incremento en la actividad y/o la expresión de la NOS. Por consiguiente es posible que un aumento del gasto cardíaco en ratas hipertiroideas (Klein, 1990), produzca un incremento de la actividad NOS con un aumento crónico en la tensión de roce en la vasculatura endotelial. En consonancia con esta idea, el hipo e hipertiroidismo presentan una disminuida y aumentada respuesta endotelial máxima, respectivamente (McAllister y cols., 1998; Vargas y cols., 1995).

### **3. Efectos del estado hipertiroideo y Tempol en el estrés oxidativo**

- **Efectos de la tiroxina sobre las variables biológicas**

Este estudio muestra los importantes efectos biológicos de la administración de dosis crecientes de T<sub>4</sub> en las ratas. Los animales tratados con T<sub>4</sub> muestran una disminución del peso corporal y un aumento del peso ventricular y del riñón, temperatura, frecuencia cardiaca, presión sanguínea y proteinuria, a medida que aumenta la dosis. Todas estas observaciones han sido previamente observadas en distintos estudios usando diferentes dosis de T<sub>4</sub> (Larsen y cols., 1998; Bradley y cols., 1974; Klein, 1990; Klein y Ojamaa, 1995; Vargas y cols., 1991; Vargas y cols., 1994), y demuestra la eficacia de la administración de T<sub>4</sub> en este estudio.

- **Estrés oxidativo en el hipertiroidismo**

Hay evidencias que indican que el hipertiroidismo en humanos y animales cursa con un incremento del estrés oxidativo (Tapia y cols., 1999; Fernández y cols., 2002; Venditti y cols., 1997; Sewerynek y cols., 2000). De acuerdo con estas observaciones, los resultados del presente estudio muestran, en ratas tratadas con T<sub>4</sub>, que la excreción urinaria de isoprostanos F<sub>2α</sub> (24h) y los niveles de MDA están aumentados de forma dosis relativa. El MDA es un índice de peroxidación lipídica y el isoprostano F<sub>2α</sub> es un marcador estable de la producción de superóxido *in vivo e in vitro* (Roberts y Morrow, 1997). Los radicales superóxido y óxido nítrico pueden combinarse químicamente para formar peroxinitritos, el cual puede oxidar de forma no enzimática al ácido araquidónico y formar isoprostano F<sub>2</sub> (Huie y Padmaja, 1993). El isoprostano F<sub>2</sub> ejerce una potente vasoconstricción y efectos antinatriuréticos (Roberts y Morrow, 1997; Takahashi y cols., 1992). El presente estudio también muestra

que el tratamiento con Tempol a largo plazo reduce la excreción urinaria de isoprostano  $F_2\alpha$  (24h) y niveles de MDA. Por consiguiente, nuestros hallazgos indican que el tratamiento oral crónico con Tempol reduce el estrés oxidativo en ratas hipertensas hipertiroideas, el cual puede contribuir al efecto beneficioso en la presión arterial de esos animales.

El estrés oxidativo puede resultar de un incremento de la generación de ERO, de un reducido sistema antioxidante, o ambos. Las defensas antioxidantes son enzimáticas y no enzimáticas, e incluyen numerosos antioxidantes endógenos y componentes de la dieta. La primera ERO producida en el organismo aeróbico es el superóxido, el cual es un agente citotóxico y tiene una alta reactividad. El superóxido es convertido a  $H_2O_2$  por un grupo de enzimas conocidas como SOD. El  $H_2O_2$  es, a su vez, convertido a agua y oxígeno molecular por otras enzimas como catalasa y GPX. La SOD, CAT, GPX son los principales componentes de defensa del sistema antioxidante y una deficiencia en estas enzimas puede causar estrés oxidativo. El presente estudio fue diseñado para determinar el efecto crónico de dosis aumentadas de  $T_4$ , el cual causa hipertensión y estrés oxidativo. Las ratas tratadas con  $T_4$  muestran un significativo descenso de la actividad SOD en la corteza renal y los ventrículos izquierdo y derecho. Estos hallazgos indican una deficiencia cuantitativa de la SOD intracelular en ratas hipertiroideas, que pueden participar en el incremento del estrés oxidativo de estos animales.

La catalasa es una proteína hemo localizada predominantemente en peroxisomas y en el interior de la membrana mitocondrial, y esta cataliza la conversión de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno molecular. La catalasa juega un importante papel en la respuesta al estrés oxidativo (Mates y cols., 1999). La actividad de la catalasa en la corteza y médula renal de ratas hipertiroideas se

mantuvo elevada, lo que puede ser una respuesta compensadora a un incremento renal de la producción de  $H_2O_2$ .

En células de mamífero la conversión de  $H_2O_2$  a agua es también llevado a cabo por la reacción con glutathion catalizada por la glutathion peroxidasa, una familia de selenoenzimas citosólicas (Mates y cols., 1999). Las actividades GPX y GR disminuyeron por la administración de  $T_4$ , excepto en la médula renal.

En general, estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo en el hipertiroidismo puede ser debido a una regulación disminuida de SOD, GPX o GR. Los efectos de los descensos observados no están claros, pero pueden estar relacionados con una reducida inactivación de  $O_2^-$ , como indicó el incremento de excreción del isoprostano  $F_2\alpha$  urinario y MDA plasmático en ratas tratadas con  $T_4$ . En consonancia con estos hechos, después del tratamiento con Tempol, un mimético de la superóxido dismutasa permeable a la membrana celular (Mitchell y cols., 1990; Samuni y cols., 1988), se revierten estas variables a niveles normales.

- **Especificidad del Tempol como agente antirradicales libres**

Los resultados del presente trabajo indican que a largo plazo la administración de Tempol atenúa el desarrollo de la hipertensión en ratas hipertensas hipertiroides. Esta observación está en consonancia con trabajos similares en SHR o ratas hipertensas deficientes de óxido nítrico (Schnackenberg y cols., 1999; Sainz y cols., 2005). Sin embargo, animales controles mostraron una respuesta no discernible de presión arterial con la administración de Tempol. Esta observación junto con el hecho de que el Tempol disminuye la excreción urinaria del isoprostano  $F_2\alpha$  (24 h) y niveles de MDA plasmático en ratas tratadas con  $T_4$  arguye contra un efecto no específico



del Tempol en la presión arterial y demuestra que, en ausencia de estrés oxidativo, la terapia antioxidante no tiene efecto en la presión sanguínea. Similares datos han sido aportados en otros modelos de hipertensión arterial, donde el Tempol reduce la presión sanguínea e isoprostanos F<sub>2</sub> (Schnackenberg y cols., 1999; Sainz y cols., 2005; Nishiyama y cols., 2001).

### **3.1. Acciones del Tempol**

- **Sistema nervioso simpático**

Recientes estudios han mostrado que la administración aguda de Tempol disminuye, en mayor grado que en ratas control, la presión sanguínea, la actividad nervioso simpático renal (ANSR), y la frecuencia cardiaca en ratas SHR (Shokoji y cols., 2003) y DOCA-Sal (Xu y cols., 2004). Se ha propuesto (Shokoji y cols., 2003) que un aumento en la producción de superóxido contribuye al desarrollo de hipertensión a través de la activación del sistema nervioso simpático, y que el Tempol reduce la presión sanguínea, inhibiendo la actividad del SNS. Sin embargo, la ausencia de cambios en la frecuencia cardiaca en las ratas tratadas con Tempol indica que el efecto en la función del SNS no debe jugar un papel importante en el efecto antihipertensivo de esta droga en nuestro estudio. Estos datos están en consonancia con observaciones previas de nuestro grupo en ratas normotensas y L-NAME hipertensas.

- **Hipertrofia cardiaca**

Es bien conocido que el estado hipertiroides está asociado con hipertrofia cardiaca (Klein, 1999; Klein y Ojamaa, 1995). La tasa peso ventricular/peso corporal, una medida relativa de la hipertrofia ventricular, incrementó en ratas tratadas con T<sub>4</sub>. Sin embargo, la tasa peso VI/VD, una

medida de la hipertrofia ventricular izquierda absoluta, se redujo por el tratamiento con T<sub>4</sub>. Estos resultados concuerdan con observaciones previas (Rodríguez-Gómez y cols., 2005). En el presente estudio, ambas tasas no se afectaron por el tratamiento con Tempol. Estos datos indican que la hipertrofia en el hipertiroidismo no está relacionada a la presión arterial, y concuerda con observaciones previas de nuestro grupo que muestran que aumentos de la presión arterial o reducciones inducidos por L-NAME o losartán, respectivamente, no modificaron la hipertrofia ventricular en ratas hipertiroides (Rodríguez-Gómez y cols., 2003). Por consiguiente, los datos sugieren que un efecto trófico directo de las hormonas tiroideas en el corazón puede ser el responsable de la hipertrofia cardíaca en el hipertiroidismo (Rodríguez-Gómez y cols., 2003). Esta propuesta está en consonancia con las observaciones de Bedoto y colaboradores (1989), los cuales aportan que la hipertrofia cardíaca en ratas hipertiroides es independiente de la sobrecarga cardíaca, y con estudios de cardiomiocitos cultivados en los cuales la hormona tiroidea promueve el crecimiento celular (Morgan y Baker, 1991).

- **Estrés oxidativo y riñón en el hipertiroidismo**

El mecanismo por el cual el Tempol reduce la presión arterial en ratas hipertensas tratadas con T<sub>4</sub> no está claro, pero un desplazamiento a la izquierda de la relación presión-natriuresis podría explicar porqué el Tempol bajó la presión arterial en ratas hipertiroides. Ratas hipertiroides hipertensas tienen un desplazamiento hacia la derecha en la respuesta presión-diuresis-natriuresis (Vargas y cols., 1994; García-Estañ y cols., 1995). En este estudio las ratas tratadas con T<sub>4</sub>+Tempol tenían la misma excreción de sodio que las ratas T<sub>4</sub>-75 con un incremento de la presión arterial. Es más, recientemente ha sido

demostrado que las ERO juegan un papel relevante en la fisiología renal y manejo renal de sodio (Zou y cols, 2001; Majid y Nishiyama, 2002). En este contexto, se ha observado que el efecto hipotensivo del Tempol en ratas SHR está acompañado de un incremento del flujo sanguíneo medular (FSM) (Feng y cols., 2001). Dado el importante papel del FSM en el control de la presión arterial a largo plazo (Cowley, 1997), el Tempol puede reducir la presión sanguínea en ratas hipertensas hipertiroideas incrementando el FSM y facilitando la excreción de sodio.

- **Proteinuria**

Los grupos tratados con T<sub>4</sub>-50 y T<sub>4</sub>-75 mostraron un incremento de proteinuria, como previamente había sido aportado por nuestro grupo en ratas hipertiroideas (Rodríguez-Gómez y cols., 2003). Estas observaciones también concuerdan con las aportaciones clínicas (Tanwani y cols., 2002) de un síndrome nefrótico atribuible a una nefropatía de cambios mínimos, una entidad clínica definida por una proteinuria que ocurre en ausencia de lesión en la pared capilar glomerular. Esta proteinuria parece no estar relacionada a la presión arterial, ya que es similar a las ratas T<sub>4</sub>-75 y T<sub>4</sub>-Tempol mientras la presión arterial fue marcadamente diferente. Estos datos concuerdan con un estudio previo en el que ratas hipertensas tratadas con T<sub>4</sub> o normotensas tratadas con T<sub>4</sub> y losartán, mostraron unos niveles similares de proteinuria (Rodríguez-Gómez y cols., 2003), proporcionando más evidencias de que la proteinuria en el estado hipertiroideo puede ser producido por una acción directa de hormonas tiroideas, incrementando la permeabilidad de la barrera glomerular. Aunque ha sido aportado que las ERO juegan un importante papel en la patogénesis de las enfermedades renales, produciendo daño vascular,

glomerular, tubular e intersticial (Wilcox, 2002). El hecho de que el Tempol no modifique la proteinuria inducida por  $T_4$ , sugiere que el estrés oxidativo no juega un papel esencial en esta anomalía renal de ratas hipertiroideas.

- **Aclaramiento de creatinina**

El aclaramiento de creatinina normalizado por g de peso de riñón solo fue significativamente reducido en grupos  $T_4$ -75. Estos resultados están de acuerdo con previas observaciones de nuestro grupo usando diferentes dosis de  $T_4$  (Vargas y cols., 1994; García-Estañ y cols., 1995; Rodríguez-Gómez y cols., 2005; Rodríguez-Gómez y cols., 2003). El presente estudio también mostró que la administración crónica de Tempol no modifica la TFG en ratas control o hipertiroideas. Además, estos resultados sugieren que el reducido aclaramiento de creatinina de ratas hipertiroideas puede ser secundario a otros factores diferentes del estrés oxidativo.

En resumen, estos resultados indican que el hipertiroidismo está asociado con una reducción de las actividades antioxidantes de SOD, GPX y GR en los tejidos cardíaco y renal y que el estrés oxidativo participa en la hipertensión inducida por  $T_4$ . Además, nosotros también observamos que el efecto antihipertensivo del Tempol en ratas tratadas con  $T_4$  no está asociado a una mejora en las anomalías renales o hipertrofia cardíaca.

El estrés oxidativo inducido por el radical superóxido y otras ERO contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, insuficiencia renal e hipertensión arterial. Este estudio muestra que el hipertiroidismo está asociado con una reducción de la actividad enzimática antioxidante de los tejidos cardíaco y renal, y que el Tempol redujo la presión

arterial en las ratas tratadas con tiroxina. Sin embargo, el mecanismo responsable es desconocido. Recientes evidencias sugieren que las ERO pueden ser utilizadas en los procesos de transducción de señal y tener importancia en la regulación de la biología y fisiología celulares. En este sentido, las ERO pueden influir en la reactividad vascular, bien directamente, o a través de una ruta intermedia, así como participar en la hemodinámica renal y en la excreción de sodio. Serían necesarios más estudios para establecer cuales de estos mecanismos posibles serían responsables del incremento de la presión arterial y de otras manifestaciones cardiovasculares y renales del hipertiroidismo.

#### **4. Efecto de la administración *crónica* de Tempol en la reactividad vascular a VC en las ratas hipertiroideas**

La administración crónica de Tempol produjo una reducción de sensibilidad a Phe en riñones controles e hipertiroideos. Los cambios de reactividad a Phe inducidos por el Tempol fueron suprimidos cuando la curva se realizó en riñones sin endotelio en los que se observó un marcado desplazamiento a la izquierda de la curva. Estos resultados claramente indican que el Tempol atenúa la respuesta al agonista  $\alpha$ -adrenergico a través de la liberación de mediadores endoteliales vasodilatadores (NO y FHDE) o por el antagonismo de la liberación de  $O_2^-$ . En este sentido, se ha descrito que el bloqueo de la NOS por infusión intravenosa de L-NAME, suprime el efecto hipotensor del Tempol, sugiriendo los autores de este trabajo que el efecto anti-hipertensor o vasodilatador del Tempol depende de su acción supresora de  $O_2^-$ , que facilita la vasodilatación inducida por el NO (Schnackenberg y cols., 1998). Sin embargo, nuestro grupo ha observado que en ratas hipertensas tratadas

con L-NAME, el Tempol disminuye significativamente la presión sanguínea (Sainz y cols., 2005), indicando que el Tempol puede reducir la presión sanguínea por una vía NO independiente. Además, se ha observado que en ausencia de producción de NO, el O<sub>2</sub> puede ejercer efectos vasoconstrictores independientes del mecanismo de bloqueo del NO (Majid y Nishiyama, 2002). Por tanto para esclarecer el mecanismo por el que el Tempol reduce la respuesta a Phe se requieren experimentos adicionales. Es conveniente destacar también que los efectos inhibitorios del Tempol sobre la reactividad a Phe se producen solamente con el tratamiento crónico, puesto que nuestro grupo ha podido observar en la misma preparación (riñón aislado y perfundido de rata), que la administración de Tempol de forma aguda, durante el desarrollo del experimento, no solo no atenúa la respuesta a Phe sino que aumenta la sensibilidad a la misma, a angiotensina II y a cloruro de bario (observaciones no publicadas).

El hecho de que la administración de Tempol reduzca la respuesta a Phe en las ratas hipertiroideas, podría sugerir la participación de este efecto en la acción antihipertensiva del Tempol en estos animales. Sin embargo el hecho de que el Tempol también reduzca la respuesta presora a Phe en las ratas controles en las cuales el Tempol no tiene efecto hipotensor siembra dudas al respecto. Aunque el referido efecto podría tener una mayor funcional en las ratas hipertiroideas hipertensas que en las controles.

Por otra parte es interesante destacar que, la curva dosis respuesta a Ang II no fue atenuada por la administración de Tempol ni en los riñones de las ratas normales ni en los procedentes de las ratas hipertiroideas. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo no participa en la respuesta presora aguda a Ang II, a pesar de que la Ang II juega un importante papel en el desarrollo de estrés oxidativo en la hipertensión y otros procesos patológicos

como evidencian los resultados descritos a continuación. Así, la Ang II puede aumentar la expresión de la subunidad catalítica de NADPH oxidasa, gp91<sup>PHOX</sup>, por lo que aumenta la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Haque y Majid, 2004). En este sentido, se ha propuesto que el efecto antihipertensivo de las drogas que interfieren con la actividad del sistema renina-angiotensina puede estar mediado por la inhibición de la activación de la NADPH oxidasa producida por la angiotensina II (Reckelhoff y Romero, 2003). En este sentido, nosotros hemos observado que la actividad antihipertensiva del losartán en las ratas con hipertensión genética se acompaña de una reducción del estrés oxidativo en estos animales (Chamorro y cols., 2004).





## ***VI. CONCLUSIONES***



1. La atenuada respuesta renal presora a Phe en el estado hipotiroideo no se debe a un aumento de la actividad de los factores relajantes derivados del endotelio, NO y FHDE.
2. Encontramos evidencias de anormalidades en la liberación del FHDE o en los canales de K<sup>+</sup> en las preparaciones hipotiroideas, dado que la curva dosis-respuesta a VC no fue incrementada por la administración de TEA. Esta anomalía, junto con la reducida reactividad del NO, puede ser una respuesta compensadora a un alterado sistema contráctil del músculo liso vascular de las ratas hipotiroideas.
3. Las preparaciones hipotiroideas tienen una reactividad reducida al NPS, donante de NO, y la vasodilatación NO-independiente no está alterada.
4. El hipertiroidismo está asociado con una reducción de las actividades antioxidantes SOD, GPX y GR en los tejidos cardíaco y renal.
5. El estrés oxidativo participa en la hipertensión inducida por T<sub>4</sub>.
6. El efecto antihipertensivo del Tempol en ratas tratadas con T<sub>4</sub> no está asociado a una mejora en las anormalidades renales o hipertrofia cardíaca.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Adeagbo ASO, and Triggle CR.** Varying extracellular  $[K^+]$ : A functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 423-429, 1993.
- Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984.
- Amezcuá JL, Dusting GJ, Palmer RM, and Moncada S.** Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator. *Br J Pharmacol* 95: 830-834, 1988.
- Amezcuá JL, Palmer RM, de Souza BM, and Moncada S.** Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol* 97: 1119-1124, 1989.
- Andrade J, Haro JM, Jódar E, Luna JD, and Vargas F.** Effects of methimazole on low renal mass hypertension: changes on blood pressure and pressor responsiveness to vasoconstrictors. *Pharmacology* 44: 315-323, 1992.
- Andrew PJ, and Mayer B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531, 1999.
- Anthonisen P, Holst E, and Thomsen AA.** Determination of cardiac output and other hemodynamic data in patients with hyper- and hypothyroidism, using dye dilution technique. *Scand J Clin Lab Invest* 12: 472-480, 1960.
- Asahi T, Shimabukuro M, Oshiro Y, Yoshida H, and Tasaku N.** Cilazapril prevents cardiac hypertrophy and postischemic myocardial dysfunction in hyperthyroid rats. *Thyroid* 11: 1009-1015, 2001.
- Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, and Kato K.** Effects of beta-adrenergic blockers with different ancillary properties on lipid peroxidation in hyperthyroid rat cardiac muscle. *Endocrinol Jpn* 36: 687-694, 1989.
- Bachmann S, and Mundel P.** Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis* 24: 112-129, 1994.

- Basset A, Blanc J, Messas E, Hagege A, and Elghozi JL.** Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 163-172, 2001.
- Beckman JS, and Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
- Bedotto JB, Gay RG, Graham SD, Morkin E, and Goldman S.** Cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone is independent of loading conditions and beta adrenoceptor blockade. *J Pharm Exp Ther* 248: 632-636, 1989.
- Beny JL, and Brunet C.** Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilatation of pig coronary arteries. *Blood Vessels* 25: 308-311, 1988.
- Beny JL, Brunet PC, and Huggel H.** Effect of mechanical stimulation, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on the electrical pig coronary arteries contracted with acetylcholine: Role of endothelium. *Pharmacology* 33: 61-68, 1986.
- Beny JL.** Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarized by bradykinin are not dye coupled. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 258: H836-H841, 1990.
- Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, and Webb RC.** Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension* 37: 781-86, 2001.
- Blantz RC, and Weir MR.** Are the oxygen costs of kidney function highly regulated? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 67-71, 2004.
- Boegehold MA.** Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 71-78, 1998.
- Bondy SC, and Naderi S.** Contribution of hepatic cytochrome P-450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 48: 155-159, 1994.



- Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, and Soubrier F.** Lack of evidence for linkage of the endothelial nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 91: 96-102, 1995.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, and Reville P.** The thyroid and the kidney. *Kidney Int* 6: 346-365, 1974.
- Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, and Busse R.** An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild type and endothelial synthase knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci* 57: 9747-9752, 2000.
- Brayden JE, Quayle JM, Standen NB, and Nelson MT.** Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. *Blood Vessels* 28: 147-153, 1991.
- Brayden JE.** Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilatation. *Am J Physiol* 259: H668-H673, 1990.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, and Snyder SH.** Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7: 615-624, 1991.
- Brown JM, and Pollock D.** The effect of thyroidectomy on the sensitivity of the vasculature of rat hindquarters to agonists. *J Physiol* 307: 77-78, 1980.
- Burnham MP, Bychkov R, Feletou M, Richards GR, Vanhoutte PM, Weston AH, and Edwards G.** Characterization of an apamine-sensitive small

- conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF. *Br J Pharmacol* 135: 1133-1143, 2002.
- Buse R, Fisthaler B, Fleming I.** Mechanisms of shear stress-dependent NO release. *Scand Physiol Soc Meet Berg* s3: 21-3, 1994.
- Busse R, and Mulch A.** Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 275: 87-90, 1990.
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, and Weston AH.** EDHF: bringing the concepts together. *TIPS* 23: 374-380, 2002.
- Büssemaker E, Popp R, Fisslthaler B, Larson CM, Fleming I, Busse R, and Brandes RP.** Hyperthyroidism enhances endothelium-dependent relaxation in the rat renal artery. *Cardiovasc Res* 59: 181-188, 2003.
- Cai S, Garneau L, and Sauve R.** Single channel characterization of the pharmacological properties of the  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$  channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 163: 147-158, 1998.
- Campbell WB, and Gauthier KM.** What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 177-183, 2002.
- Campbell WB, and Harder DR.** Prologue: EDHF--what is it?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2413-H2416, 2001.
- Capo LA, and Sillau AH.** The effects of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. *J Physiol* 342: 1-14, 1983.
- Carlberg I, and Mannervik B.** Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-490, 1985.
- Carreras MC, Peralta JG, Converso DP, Finocchietto PV, Rebagliatti I, Zaninovich AA, and Poderoso JJ.** Modulation of liver mitochondrial NOS is

- implicated in thyroid-dependent regulation of O<sub>2</sub> uptake. *Am J Physiol* 281: H2282-H2288, 2001.
- Celsing F, Blomstrand E, Melichna J, Terrados N, Clausen N, Lins PE, and Jansson E.** Effect of hyperthyroidism on fibre-type composition, fibre area, glycogen content and enzyme activity in human skeletal muscle. *Clin Physiol* 6: 171-181, 1986.
- Chakrabarti N, and Ray AK.** Rise of intrasynaptosomal Ca<sup>2+</sup> level and activation of nitric oxide synthase in adult rat cerebral cortex pretreated with 3-5-3'-L-triiodothyronine. *Neuropsychopharmacology* 22: 36-41, 2000.
- Chamorro V, Wangensteen R, Sainz J, Duarte J, O'Valle F, Osuna A, and Vargas F.** Protective effects of angiotensin type I (AT1) receptor blockade in low-renin deoxycorticosterone acetate (DOCA)-treated spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 106: 251-259, 2004.
- Chen G, and Suzuki H.** Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle of the rabbit carotid artery. *J Physiol* 421: 521-534, 1990.
- Chen G, and Suzuki H.** Direct and indirect actions of acetylcholine and histamine on intrapulmonary artery and vein muscles of the rat. *Jpn J Physiol* 39: 51-65, 1989.
- Chen G, Suzuki H, and Weston AH.** Acetylcholine released endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 95: 1165-1174, 1988.
- Cho H.** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176: 599-604, 1992.
- Clair DK, and Chow CK.** Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA. In: Punched NA, Kelli FJ (editors): *Free Radicals: A practical approach*. Oxford University Press; 1996, p. 227-240.

- Clark SG, and Fuchs LC.** BKCa channels compensate for loss of NOS dependent coronary artery relaxation in cardiomyopathy. *Am J Physiol* 279: H2598-H2603, 2000.
- Cohen RA, and Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization: Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92: 3337-3349, 1995.
- Combes A, McTiernan C, Brooks SS, and Feldman AM.** UV light synergistically enhances the cardiotoxic effects of interleukin 1b through peroxynitrite formation. *J Cardiac Fail* 7: 165-75, 2001
- Cosentino F, and Lüscher TF.** Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 43: 274-78, 1999.
- Cosentino F, and Lüscher TF.** Tetrahydrobiopterin and endothelial function. *Eur Heart J* 19: G3-G8, 1998.
- Cowley AW, Mattson DL, Lu S, and Roman RJ.** The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 25: 663-673, 1995.
- Cutler RE, Glatte H, and Dowling JT.** Effect of hyperthyroidism on the renal concentrating mechanism in humans. *J Clin Endocrinol* 27: 453-460, 1967.
- Dahlöf B.** Factors involved in the pathogenesis of hypertensive cardiovascular hypertrophy. A review. *Drugs* 35: 6-26, 1988.
- Davies NW.** Modulation of ATP-sensitive K channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature* 343: 375-377, 1990.
- Davydov DR.** Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem Sci* 26: 155-160, 2001.
- De Mey J, and Vanhoutte PM.** Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol* 316: 437-455, 1981.
- Delp MD, McAllister RM, and Laughlin MH.** Exercise training alters aortic vascular reactivity in hypothyroid rats. *Am J Physiol* 268: H1428-H1435, 1995.

- Dicker A, Raasmaja A, Cannon B, and Nedergaard J.** Increased  $\alpha_1$ -adrenoceptor density in brown adipose tissue indicates recruitment drive in hypothyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263: E654–E662, 1992.
- Dora KA, Garland CJ, Kwan HY, and Yao X.** Endothelial cell protein kinase G inhibits release of EDHF through a PKG-sensitive cation channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1272–H1277, 2001.
- Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, Galisteo M, Perez-Palencia R, Vargas F, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, and Tamargo J.** Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens* 20: 1843–1854, 2002.
- Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J.** Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 133: 117–124, 2001.
- Ekelund U, and Mellander S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of tonus in large-bore arterial resistance vessels, arterioles and veins in cat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 140: 301–309, 1990.
- Emmanuel DS, Lindheimer MD, and Katz IA.** Mechanism of impaired water excretion in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 54: 926–934, 1974.
- Ercan ZS, Soydan AS, and Türker RZ.** Possible involvement of endothelium in the responses of various vasoactive agents in rabbit isolated perfused kidney. *Gen Pharmacol* 21: 205–209, 1990.
- Esterbauer H, and Cheeseman KH.** Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407–421, 1990.
- Evans RG, and Fitzgerald SM.** Nitric oxide and superoxide in the renal medulla: a delicate balancing act. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 9–15, 2005.

- Feletou M, and Vanhoutte P.** The alternative: EDHF. *J Mol Cell Cardiol* 31: 15-22, 1999.
- Feletou M, and Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93: 515-24, 1988.
- Feng MG, Dukacz SA, and Kline RL.** Selective effect of Tempol on renal medullary hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 281: R1420-R1425, 2001.
- Fernandez V, and Videla LA.** Biochemical aspects of cellular antioxidant systems. *Biol Res* 29: 177-182, 1996.
- Fernandez V, Cornejo P, Tapia G, and Videla LA.** Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide* 1: 463-468, 1997.
- Fernandez V, Videla LA, Tapia G, and Israel Y.** Increases in tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radic Res* 36: 719-725, 2002.
- Field FP, Janis RA, and Triggle DJ.** Relationship between aortic reactivity and blood pressure of renal hypertensive, hyperthyroid, and hypothyroid rats. *Canad J Physiol* 51: 344-353, 1973.
- Fleming I, Gray GA, Schott C, and Stoclet JC.** Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 200: 375-376, 1991.
- Fleming I.** Cytochrome P-450 enzymes in vascular homeostasis. *Circ Res* 89: 753-762, 2001.
- Ford RV, Owens JC, Curd GW, Moyer SH, and Spurr CL.** Kidney function in various thyroid states. *J Clin Endocrinol* 21: 548-553, 1961.

- Fregly MJ, Brimhall RL, and Galindo OJ.** Effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the sodium balance of rats. *Endocrinology* 71: 693-700, 1962.
- Furchgott R, and Zawadzki J.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-378, 1980.
- Furchgott RF, and Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018, 1989.
- Furchgott RF, Zawadzki JV, and Cherry PD.** Role of endothelium in vasodilator response to acetylcholine. In: Vanhoutte PM, I Leusen I, eds. Vasodilation. New York, Raven Press, 1981, p. 49-66.
- Furchgott RF.** Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Cir Res* 53: 557-573, 1983.
- Furchgott RF.** The discovery of endothelium-dependent relaxation. *Circulation* 87 (suppl V): V3-V8, 1993.
- Garcia del Rio C, Moreno MRR, Osuna A, Luna JD, Garcia-Estañ J, and Vargas F.** Role of the renin-angiotensin system in the development of thyroxine-induced hypertension. *Eur J Endocrinol* 136: 656-660, 1997.
- Garcia-Estañ J, Atucha N, Quesada T, and Vargas F.** Involvement of the renin-angiotensin in the reduced pressure-natriuresis response of hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 268: E897-E901, 1995.
- Garcia-Estañ J, Atucha NM, Sabio JM, Vargas F, Quesada T, and Romero JC.** Increased endothelium-dependent renal vasodilation in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 267: R549-R553, 1994.
- Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, and Moncada S.** Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 15: 486-492, 1990.

- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, and Cocks TM.** Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 16: 23-30, 1995.
- Gerdes AM, Moore JA, and Bishop SP.** Failure of propranolol to prevent chronic hyperthyroid induced cardiac hyperthyryphy and multifocal cellular necrosis in the rat. *Can J Cardiol* 1: 340-345, 1985.
- Gerdes AM, Moore JA, and Hines JM.** Regional changes in myocyte size and number in propranolol-treated hyperthyroid rats. *Lab Invest* 57: 708-713, 1987.
- Giavarotti S, Rodrigues L, Rodrigues T, Junqueira VB, and Videla LA.** Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Radic Res* 29: 35-42,1998.
- Graettinger JS, Muenster JJ, Checchia CS, Grissom RL, and Campbell JA.** A correlation of clinical and hemodynamic studies in patients with hypothyroidism. *J Clin Invest* 37: 501-510, 1957.
- Graettinger JS, Muenster JJ, Silverstone LA, and Campbell JA.** A correlation of clinical and hemodynamic studies of patients with hyperthyroidism and with congestive heart failure. *J Clin Invest* 40: 1316-1329, 1959.
- Grassby PF, and McNeill JH.** Hyperthyroidism induces supersensitivity to biogenic amines in rat vascular tissue via a pre- and postjunctional mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 1027-1035, 1988.
- Gredilla R, Barja G, and Lopez-Torres M.** Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. *Free Radic Res* 35: 417-425, 2001.
- Griendling KK, Sorescu D, and Ushio-Fukai M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.



- Grieve DJ, Fletcher S, Pitsillides AA, Botham KM, and Elliot J.** Effects of oral propylthiouracil treatment on nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol* 127: 1-8, 1999.
- Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Harrison TJ, and Evans KT.** EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. *Nature* 329: 442-445, 1987.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, and Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456, 1986.
- Gunasekera RD, and Kuriyama H.** The influence of thyroid states upon responses of the rat aorta to catecholamines. *Br J Pharmacol* 99: 541-547, 1990.
- Guyton AC.** Arterial pressure and hypertension. Pp 564. Philadelphia: Saunders, 1980.
- Haas JA, Krier JD, Bolterman RJ, Juncos LA, and Romero JC.** Low-dose angiotensin II increases free isoprostane levels in plasma. *Hypertension* 34: 983-986, 1999.
- Haque MZ, and Majid DS.** Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91PHOX subunit of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 335-340, 2004.
- Harrison DG.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100: 2153-2157, 1997.
- Hecker M.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor: fact or fiction?. *News Physiol Sci* 15: 1-5, 2000.
- Hennington BS, Zhang H, Miller MT, JP Granger, and Reckelhoff JF.** Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 31: 283-288, 1998.

- Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JGF, Shah AM, and Paulus WJ.** Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99: 3009-3016, 1999.
- Hibbs J, Taintor RR, Vavrin Z, and Rachlin EM.** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94, 1988.
- Hibbs J.** Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrate. *Science* 235: 473-476, 1987.
- Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Kimura K, Kikuchi K, Nagano T, Hirobe M, and Omata M.** Direct measurement of endothelium-derived nitric oxide release by stimulation of endothelin receptors in rat kidney and its alterations in salt induced hypertension. *Circulation* 91: 1229-1235, 1995.
- Hoefner U, Feletou M, Flavaham NA, and Vanhoutte PM.** Canine arteries release two different endothelium-derived relaxing factors. *Am J Physiol* 255: H330-H333, 1989.
- Hoger JH, Ilyin VI, Forsyth S, and Hoger A.** Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *Proc Soc Acad Sci* 99: 7780-7785, 2002.
- Holmes EW, and DiScala V.** Studies on the exaggerated natriuretic response to a saline infusion in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 49: 1224-1236, 1970.
- Honda H, Iwata T, Mochizuki T, and Kogo H.** Changes in vascular reactivity induced by acute hyperthyroidism in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol* 34: 429-434, 2000.
- Huh K, Kwon TH, Kim JS, and Park JM.** Role of the hepatic xantine oxidase in thyroid dysfunction: effect of thyroid hormones in oxidative stress in rat liver. *Arch Pharm Res* 21: 236-240, 1998.
- Huie RE, and Padmaja S.** The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199, 1993.

- Ichikawa I, Kiyama S, and Yoshioka T.** Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45: 1-9, 1994.
- Ignarro L, Byrns RE, Buga GM, and Wood KS.** Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of NO radical. *Circ Res* 61: 866-879, 1987.
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, and Kadowitz PJ.** Dissimilarities between methylene blue and cyanide on relaxation and cyclic GMP formation in endothelium-intact intrapulmonary artery caused by nitrogen oxide-containing vasodilators and acetylcholine. *J Pharmacol Exp Ther* 236: 30-36, 1986.
- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, and Gruetter CA.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 218: 739-749, 1981.
- Ishac E, and Pennefather JN.** The influence of the thyroid state upon responses to noradrenaline and phentolamine in perfused mesenteric arterioles from the rat. *J Pharm Pharmacol* 35: 466-468, 1983.
- Ishii K, Chang B, Kerwin JF Jr, Huang ZJ, and Murad F.** N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine. A potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur J Pharmacol* 176: 219-223, 1990.
- Ishikawa T, Chijiwa T, Hagiwara M, Mamiya S, and Hidaka H.** Thyroid hormones directly interact with vascular smooth muscle strips. *Mol Pharm* 35: 760-765, 1989.

- Iwata T, and Honda H.** Acute hyperthyroidism alters adrenoceptor- and muscarinic receptor-mediated responses in isolated rat renal and femoral arteries. *Eur J Pharmacol* 493: 191-199, 2004.
- Kapitola J, and Vilimovska D.** Inhibition of the early circulatory effects of triiodothyronine in rats by propranolol. *Physiol Bohemoslov* 30: 347-351, 1981.
- Katusic ZS, Moncada S, and Vanhoutte PM.** Inhibitory effect of NG<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxations to vasopressin, in Moncada S, Higgs EA (eds): Nitric Oxide from L-arginine: A Biorregulatory System. London, Elsevier Science Publishers BV, 1990, chap 8, p 69-72.
- Katz IA, and Lindheimer MD.** Renal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption. *J Clin Invest* 53: 796-804, 1973.
- Kim KM, Paeng KJ, Hahm JR, Kim DR, and Chung BC.** Elevated urinary 8-isoprostaglandin F<sub>2</sub> in females with Graves' hyperthyroidism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71:143-147, 2004.
- Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, and Wilcox CS.** Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol* 14: 2775-2782, 2003.
- Klein I, and Hong C.** Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted heart. *J Clin Invest* 77: 1694-1698, 1986.
- Klein I, and Ojamaa K.** Thyroid hormone and blood pressure regulation. In: Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management (2nd ed), edited by Laragh JH and Brenner BN. New York: Raven Press Ltd, 1995, p. 2247-2262.

- Klein I, and Ojamaa K.** Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344: 501-509, 2001.
- Klein I.** Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* 88: 631-637, 1990.
- Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, and Saruta T.** Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. *J Endocrinol* 160: 43-47, 1999.
- Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, and Saruta T.** Mechanism of hyperthyroidism-induced renal hypertrophy. *J Endocrinol* 159: 9-14, 1998.
- Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M, and Saruta T.** Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *Am J Physiol* 273: H593-H599, 1997.
- Koehn MA, Schindler WJ, and Stanton HC.** Thyroid state and vascular reactivity in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 861-864, 1967.
- Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, and Romero JC.** Effects of L-Arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 261: F1033-F1037, 1991.
- Larsen PR, Davis TF, and Hay ID.** The thyroid gland. In: Williams textbook of endocrinology (6th ed), edited by Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HK and Larsen PR. London: WB Saunders, 1998, p. 389-515.
- Lasegue B, and Griendling KK.** Out phoxing the endothelium. What's left without p47?. *Circ Res* 90: 123-24, 2002.
- Li H, Brodsky S, Basco M, Romanov V, De Angelis DA, and Goligorsky MS.** Nitric oxide attenuates signal transduction. Possible role in dissociating caveolin-1 scaffold. *Circ Res* 88: 229-236, 2001.
- Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, and Kanno M.** Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of

- female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 132: 1035-1046, 2001.
- Lockette W, Otsuka Y, and Hirt E.** The endothelium and cyclic guanosine monophosphate in hyperthyroid induced hypertension. *Agents Actions Suppl* 22: 125-132, 1987.
- Lopez B, García-Salom M, Arregui B, Valero F, and Fenoy FJ.** Role of Superoxide in Modulating the Renal Effects of Angiotensin II. *Hipertensión* 42: 1150-1156, 2003.
- Lowenstein D.** Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine* 120: 227-37, 1994.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, and Castillo A.** Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol* 287: R27-R32, 2004.
- Majid DS, Williams A, Kadowitz PJ, and Navar LG.** Renal responses to intra-arterial administration of nitric oxide donors in dogs. *Hypertension* 22: 535-541, 1993.
- Majid DSA, and Nishiyama A.** Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 39: 293-297, 2002.
- Makino A, Skelton MM, Zou AP, Roman RJ, and Cowley AW Jr.** Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension* 39: 667-672, 2002.
- Malmsjö M, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, and Erlinge D.** Enhanced acetylcholine and PY2-receptor stimulated vascular EDHF-dilatation in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 200-209, 1999.

- Marchant C, Brown L, and Sernia C.** Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 449-55, 1993.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, and Schappert KT.** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry* 268: 17478-17488, 1993.
- Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, St John J, Gines P, and Schrier RW.** Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *American Journal of Physiology* 270: F494-F499, 1996.
- Mattson DL, and Higgins DJ.** Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension* 27: 688-692, 1996.
- McAllister RM, Grossenburg VD, Delp MD, and Laughlin MH.** Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. *Am J Physiol* 274: E946-E953, 1998.
- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, and Moncada S.** Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 261: 293-296, 1989.
- McCord JM.** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
- McLeod JD, and Piper PJ.** Effects of K<sub>v</sub> channel-modulating drugs on the vasoconstrictor responses of leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and angiotensin II in the guinea-pig isolated perfused heart. *Br J Pharmacol* 105: 739-743, 1992.
- Michael UF, Barenberg RL, Chavez R, Vaamonde CA, and Paper S.** Renal handling of sodium and water in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 51: 1405-1412, 1972.

- Millat LJ, Abdel-Rahman EM, and Siragy HM.** Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept* 81: 1-10, 1999.
- Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, and Russo A.** Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimetics. *Biochemistry* 29: 2802-2807, 1990.
- Miyazawa K, Hashimoto H, and Nakashima M.** Altered responsiveness of coronary arteries in hyperthyroid rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 297: 120-132, 1989.
- Moncada S, and Higgs A.** The L-arginina- nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2010, 1993.
- Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac Rev* 43: 109-142, 1991.
- Morgan HE, and Baker KM.** Cardiac hypertrophy: mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83: 13-25, 1991.
- Mori T, and Cowley AW Jr.** Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose. *Hypertension* 43: 341-346, 2004.
- Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, and Harrison DG.** Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol* 260: C219-C225, 1991.
- Murphey LJ, Morrow JD, Sawathiparnich P, Williams GH, Vaughan DE, and Brown NJ.** Acute angiotensin II increases plasma F2-isoprostanes in salt-replete human hypertensives. *Free Radic Biol Med* 35: 711-718, 2003.
- Murrel W.** Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1: 80-81, 1879.



- Nagao T, and Vanhoutte PM.** Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries. *J Physiol* 445: 355-368, 1992.
- Nagao T, and Vanhoutte PM.** Membrane hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations induced by acetylcholine in the femoral vein of the rat. *Am J Physiol* 261: H1034-H1038, 1991.
- Nagao T, Illiano S, and Vanhoutte PM.** Calmodulin antagonists inhibit endothelium-dependent hyperpolarization in the canine coronary artery. *Br J Pharmacol* 107: 137-144, 1992.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, and Murad F.** Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316: 175-180, 1993.
- Ni Z, Morcos S, and Vaziri ND.** Up-regulation of renal and vascular nitric oxide synthase in iron-deficiency anemia. *Kidney International* 52: 195-201, 1997.
- Nishiyama A, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, and Abe Y.** Systemic and regional hemodynamic responses to Tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension* 37: 77-83, 2001.
- Nodaud S, Philippe M, Arnal J, Michel B, and Soubrier F.** Sustained in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ Res* 79: 857-863, 1996.
- Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orsio S, Remuzzi G, and Remuzzi A.** Nitric oxide síntesis by cultured endotelial cells is modulated by flor conditions. *Circ Res* 76: 536-543, 1995.
- Ohhashi T, and Takahashi N.** Acetylcholine-induced release of endothelium-derived relaxing factor from lymphatic endothelial cells. *Am J Physiol* 260: H1172-H1178, 1991.

- Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal Biochem* 95: 351-358, 1979.
- Ohyanagi M, Nishigaki K, and Faber JE.** Interaction between microvascular alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 71: 188-200, 1992.
- Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, Burke-Wolin T, and Wolin MS.** Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circ Res* 69: 601-608, 1991.
- Palmer RM, Ashton DS, and Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988a.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, and Moncada S.** L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium - dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1251-1256, 1988b.
- Palmer RMJ, Ferrige AJ, and Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- Paulus WJ, Frantz S, and Kelly RA.** Nitric oxide and cardiac contractility in human heart failure. *Circulation* 104: 2260-2262, 2001.
- Pearson PJ, and Vanhoutte PM.** Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 122: 1-67, 1993.
- Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Hedqvist P, and Moncada S.** Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation in vivo. *Br J Pharmacol* 100: 463-466, 1990.
- Pfister SL, Falck JR, and Campbell WB.** Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta. *Am J Physiol* 261: H843-H852, 1991.

- Plane F, and Garland CJ.** Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levcromakalim on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. *Br J Pharmacol* 110: 651-656, 1993.
- Pomposiello SI, Carroll MA, Falck JR, and McGiff JC.** Epoxyeicosatrienoic acid-mediated renal vasodilatation to arachidonic acid is enhanced in SHR. *Hypertension* 37: 887-893, 2001.
- Poss WB, Timmons OD, Farrukh IS, Hoidal JR, and Michael JR.** Inhaled nitric oxide prevents the increase in pulmonary vascular permeability caused by hydrogen peroxide. *J Appl Physiol* 79: 886-891, 1995.
- Prieto D, Simonsen U, Hernandez M, and Garcia-Sacristan A.** Contribution of K<sup>+</sup> channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br J Pharmacol* 123: 1609-1620, 1998.
- Pryor WA, and Squadrito GL.** The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268: L699-L725, 1995.
- Puntarulo S, and Cederbaum AI.** Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P-450 enzymes. *Free Radical Biol Med* 24: 1324-1330, 1998.
- Quesada A, Sainz J, Wangensteen R, Rodriguez-Gomez I, Vargas F, and Osuna A.** Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Endocrinol* 147: 117-122, 2002.
- Quilley J, and McGiff JC.** Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid?. *Trends Pharmacol Sci* 21: 121-124, 2000.
- Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S.** Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 87: 10043-10047, 1990.

- Rahmani MA, Cheema IR, Sen S, Peoples B, and Riley SR.** The effect of hyperthyroidism and hypothyroidism on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic responsiveness in rat aortic smooth muscle. *Artery* 14: 362-383, 1987.
- Ralevic V, Khalil Z, Dusting GJ, and Helme RD.** Nitric oxide and sensory nerves are involved in the vasodilator response to acetylcholine but not calcitonin gene-related peptide in rat skin microvasculature. *Br J Pharmacol* 106: 650-655, 1992.
- Ranjan V, Xiao Z, and Diamond SL.** Constitutive NOS expresión in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol* 269: H550-H555, 1995.
- Rapoport RM, Draznin MB, and Murad F.** Endothelium-dependent vasodilator-and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Assoc Am Physicians* 96: 19-30, 1983.
- Reckelhoff JF, and Romero JC.** Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R893-R912, 2003.
- Rees DD, Palmer RM, and Moncada S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci* 86: 3375-3378, 1989.
- Roberts LJ, and Morrow JD.** The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1345: 121-135, 1997.
- Rodriguez-Gomez I, Sainz J, Wangensteen R, Moreno JM, Duarte J, Osuna A, and Vargas F.** Increased pressor sensitivity to chronic nitric oxide deficiency in hyperthyroid rats. *Hypertension* 42: 220-225, 2003.
- Rodriguez-Gomez I, Wangensteen R, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A and Vargas F.** Effects of chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase in hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 288: E1252-1257, 2005.

- Rogers NE, and Ignarro LJ.** Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 242-249, 1992.
- Romero JC, Lahera V, Salom MG, and Biondi ML.** Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2: 1371-1387, 1992.
- Rubanyi GM, Romero JC, and Vanhoutte PM.** Flow-induced release of endothelium - derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: 1145-1149, 1986.
- Rubanyi GM, and Vanhoutte PM.** Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 250: H815-H821, 1986.
- Rubanyi GM, and Vanhoutte PM.** Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H822-H827, 1986.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, and Harder DR.** Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels* 27: 246-257, 1990.
- Sabineau J-P, and Marthan R.** Effect of cromakalim on KCl-, noradrenaline- and angiotensin II-induced contractions in the rat pulmonary artery. *Pulm Pharmacol* 6: 41-48, 1993.
- Sabio JM, Rodriguez-Maresca M, Luna JD, Garcia del Rio C, and Vargas F.** Vascular reactivity to vasoconstrictors in aorta and renal vasculature from hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology* 49: 257-264, 1994.
- Sainz J, Wangenstein R, Rodríguez-Gómez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P, and Vargas F.** Antioxidant enzymes and effects of Tempol, a membrane permeable radical scavenger, on the development of NO inhibition induced hypertension. *Am J Hypertens* 18: 871-877, 2005.

- Sanford CF, Griffon EE, and Wildenthal K.** Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res* 43: 688-694, 1978.
- Sawant BU, Nadkarni GD, Thakare UR, Joseph LJ, and Rajan MG.** Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in kidney of hypothyroid and hyperthyroid rats. *Indian J Exp Biol.* 41: 1334-1337, 2003.
- Schini-Kerth VB, and Vanhoutte PM.** Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp Physiol* 80: 885-905, 1995.
- Schmidt HW, Lohmann SM, and Walter U.** The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-175, 1993.
- Schnackenberg CG, and Wilcox CS.** Two-week administration of Tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f<sub>2</sub>alpha. *Hypertension* 33: 424-428, 1999.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, and Wilcox CS.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59-64, 1998.
- Schulz R, Nava E, and Moncada S.** Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 105: 575-580, 1992.
- Scivoletto R, Fortes ZB, and García-Leme J.** Thyroid hormones and vascular reactivity: role of the endothelial cell. *Eur J Pharmacol* 129: 271-278, 1986.
- Sewerynek J, Wiktorska J, Novak D, and Lewinski A.** Methimazole protection against oxidative stress induced by hyperthyroidism in Graves disease. *Endocr Regul* 34: 83-89, 2000.

- Seymen HO, Civelek S, Seven A, Yigit G, Hatemi H, and Burkak G.** Iron supplementation in experimental hyperthyroidism: effects of oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Yonsei Med J* 45: 413-418, 2004.
- Seymen HO, Seven A, Civelek S, Yigit G, Hatemi H, and Burkak G.** Evaluation of antioxidant status in liver tissues: effects of iron supplementation in experimental hyperthyroidism. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 10: 315-325, 1999.
- Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Hitomi H, Kiyomoto H, Takahashi N, Kimura S, Kohno S, and Abe Y.** Renal sympathetic nerve responses to Tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41: 266-273, 2003.
- Shulz R.** La familia de las enzimas sintetizadoras del óxido nítrico. En: P. López-Jaramillo, editor. Ediciones científicas. La vía L-arginina óxido nítrico: de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas. Quito, 1995, p. 23-50.
- Shymal Das, and Keshava N.** Nitric oxide: its identity and role in blood pressure control. *Life Sciences* 57: 1547-1556, 1995.
- Singh G, Thompson EB, and Gulati A.** Altered endothelin 1 concentration in the brain and peripheral regions during thyroid dysfunction. *Pharmacology* 49: 184-191, 1994.
- Stephan F, Jahn H, and Reville P.** Etude comparative de la concentration, de la composition et du débit des urines du rat normal et du rat hypothyroïdien soumis a des épreuves aiguës de surcharge isotonique. *J Physiol* 56 : 233-258, 1964.
- Stratton DB, and Morrow RJ.** Calcium mobilization and sensitivity in intact and triton skinned aorta from thyropathologic rats. *Life Sci* 48: 2207-2214, 1991.
- Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Buralli S, and Aalvetti A.** Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory

- mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation* 100: 1400-1405, 1999.
- Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, and Bard KF.** Glomerular actions of free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>α, in the rat. *J Clin Invest* 90: 136-141, 1992.
- Takiguchi Y, Satoh N, Hashimoto H, and Nakashima M.** Changes in vascular reactivity in experimental diabetic rats: comparison with hypothyroid rats. *Blood vessels* 25: 250-260, 1988.
- Tanwani LK, Lohano V, Broadstone VL, and Mokshagundam SP.** Minimal change nephropathy and graves' disease: report of a case and review of the literature. *Endocr Pract* 8: 40-43, 2002.
- Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA.** Protein oxidation in the thyroid hormona-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 106: 209-214, 1999.
- Taylor RE, and Fregly MJ.** Renal response of propylthiouracil-treated rats to injected mineralocorticoids. *Endocrinology* 75: 33-41, 1964.
- Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Watanabe H, Akaishi Y, Sato A, Kim TQ, Sakuma I, Kitabatake A, and Kanno M.** Role of endothelial Ni<sup>2+</sup>-sensitive Ca<sup>2+</sup> entry Pathway in regulation of EDHF in porcine coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H730-H737, 2001.
- Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, and Harrison DG.** Regulation of endothelial cells nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269: C1371-C1378, 1995.



- Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, and Lightman SL.** Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 136: 4182-4187, 1995.
- Van der Schoot JB, and Moran NC.** An experimental evaluation of the reputed influence of thyroxine on the cardiovascular effects of the catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 149: 336-345, 1965.
- Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 18 (Suppl E): 19-29, 1997.
- Vanhoutte PM.** Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13: 658-667, 1989.
- Vanhoutte PM.** Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 87 (suppl V): V9-V17, 1993.
- Vanhoutte PM.** The endothelium: modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med* 319: 512-513, 1988.
- Vargas F, and Osuna A.** Modulatory role of endothelium-derived relaxing factors on the response to vasoconstrictors and flow-pressure curve in the isolated perfused rat kidney. *J Vasc Res* 33: 119-123, 1996.
- Vargas F, Atucha N, Sabio JM, Quesada T, and Garcia-Estañ J.** Pressure-diuresis-natriuresis response in hyper- and hypothyroid rats. *Clin Sci* 87: 323-328, 1994.
- Vargas F, Baz MJ, Andrade J, Luna JD, and Haro JM.** Thyroid state and pressor responsiveness to vasoconstrictors in conscious rats. *Med Sci Res* 19: 239-241, 1991.
- Vargas F, Baz MJ, Luna JD, Andrade J, Jodar E, and Haro JM.** Urinary excretion of digoxin-like immunoreactive factor and arginine-vasopressin in hyper- and hypo-thyroid rats. *Clin Sci* 81: 471-476, 1991.

- Vargas F, Fernandez-Rivas A, and Osuna A.** Effects of methimazole in the early and established phases of L-NAME hypertension. *Eur J Endocrinol* 135: 506-513, 1996.
- Vargas F, Fernandez-Rivas A, Garcia-Estañ J, and Garcia del Rio C.** Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology* 51: 308-314, 1995.
- Vargas F, Garcia del Rio C, Luna JD, Haro JM, and Osorio C.** Studies on the thyroid activity in deoxycorticosterone salt and Goldblatt two-kidney one clip hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118: 22-30, 1988.
- Vargas F, Montes R, Sabio JM, and García-Estañ J.** Role of nitric oxide in the systemic circulation of conscious hyper- and hypothyroid rats. *Gen Pharmacol* 25: 887-891, 1994.
- Vargas F, Osuna A, and Fernandez-Rivas A.** Renal vascular reactivity to ATP in hyper- and hypothyroid rats. *Experientia* 52: 225-229, 1996.
- Vargas F, Osuna A, and Fernandez-Rivas A.** Vascular reactivity and flow-pressure curve in isolated kidneys from rats with N-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *J Hypertens* 14: 373-379, 1996.
- Vargas F, Sabio JM, and Luna JD.** Contribution of endothelium-derived relaxing factors to acetylcholine-induced vasodilatation in the rat kidney. *Cardiovasc Res* 28: 1373-1377, 1994.
- Vaziri ND, Zhenmin N, and Oveisi F.** Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31: 1248-1254, 1998.
- Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, and De Leo T.** Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 155: 151-157, 1997.

- Wangensteen R, Moreno JM, Sainz J, Rodriguez-Gomez I, Chamorro V, Luna J de D, Osuna A, and Vargas F.** Gender difference in the role of endothelium-derived relaxing factors modulating renal vascular reactivity. *Eur J Pharmacol* 486: 281-288, 2004.
- Weetman AP, Tomlinson K, Amos N, Lazarus JH, Hall R, and McGregor AM.** Proteinuria in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 109: 341-347, 1985.
- White K, and Marletta M.** Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 31: 6627-6631, 1992.
- White RM, Rivera CO, and Davison CA.** Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms account for gender differences in vasodilation to acetylcholine. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 375-380, 2000.
- Wilcox CS.** Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep* 4: 160-166, 2002.
- Wolin MS, Gupte SA, Iesaki T, and Mohazzab-H KM.** En: Kadowitz PJ, McNamara DB, eds, Nitric Oxide and the Regulation of the Peripheral Circulation. Boston: Birkhäuser, 2000, p. 33-48.
- Woolfson RG, and Poston L.** Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. *Clin Sci* 79: 273-28, 1990.
- Wu L, and de Champlain J.** Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats. *Hypertension* 34: 1247-1253, 1999.
- Wu R, Millette E, Wu L, and de Champlain J.** Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 741-748, 2001.

- Wu Y, Huang A, Sun D, Falck JR, Koller A, and Kaley G.** Gender specific compensation for the lack of nitric oxide in the mediation of flow-induced arteriolar dilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2456-H2461, 2001.
- Xiao Z, Zhang Z, and Diamond SL.** Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium dependent but not calcium-activated. *Journal of Cell Physiology* 171: 205-211, 1997.
- Xu H, Fink GD, and Galligan JJ.** Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup> in DOCA-salt rats. *Hypertension* 43: 1-6, 2004.
- Yang ZH, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, and Luscher TF.** Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. *Circ Res* 68: 52-60, 1991.
- Yavuz D, Koc M, Toprak A, Akpınar I, Velioglu A, Deyneli O, Haklar G, and Akalin S.** Effects of ACE inhibition and AT(1)-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 4: 197-203, 2003.
- Zou AP, and Cowley AW Jr.** Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study. *Hypertension* 29: 194-198, 1997.
- Zou AP, Li N, and Cowley AW Jr.** Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension* 37: 547-553, 2001.
- Zsoter T, Tom H, and Chappel C.** Effect of thyroid hormones on vascular response. *J Lab Clin Med* 64: 433-441, 1964.
- Zwaveling J, Batink HD, De Jong J, Winkler-Prins EA, Pfaffendorf M, and Van Zwieten PA.** Thyroid hormone modulates inotropic responses,  $\alpha$ -adrenoceptor density and catecholamine concentrations in the rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354: 755-764, 1996.

**Zwaveling J, Pfaffendorf M, and van Zwieten PA.** The influence of hyperthyroidism on vasoconstrictor and vasodilator responses in isolated coronary and renal resistance arteries. *Pharmacology* 55: 117-125, 1997.

**Zwaveling J, Winkler Prins EA, Maas MAW, Pfaffendorf M, and van Zwieten PA.** The influence of hyperthyroidism on pharmacological induced contractions of isolated resistance arteries. *Eur J Pharmacol* 300: 91-97, 1996.