

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



**TESIS DOCTORAL**

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL  
INDUCIDA POR AUMENTO DE ESTRÉS OXIDATIVO: INTERACCIONES  
CON OTROS FACTORES PATOGÉNICOS**

Yolanda Baca Morilla

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Yolanda Baca Morilla  
D.L.: GR 1688-2013  
ISBN: 978-84-9028-570-1



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

**Certifica:** Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: MECANISMOS IMPLICADOS EN LA HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR AUMENTO DE ESTRÉS OXIDATIVO: INTERACCIONES CON OTROS FACTORES PATOGÉNICOS, presentada por Yolanda Baca Morilla, 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 10 de Diciembre de 2012

Fdo. José Félix Vargas Palomares



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

**Certifica:** Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: MECANISMOS IMPLICADOS EN LA HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR AUMENTO DE ESTRÉS OXIDATIVO: INTERACCIONES CON OTROS FACTORES PATOGÉNICOS, presentada por Yolanda Baca Morilla, 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 10 de Diciembre de 2012

Fdo. Antonio Osuna Ortega



ISABEL RODRÍGUEZ GÓMEZ, DOCTORA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS EN LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Certifica:** Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada MECANISMOS IMPLICADOS EN LA HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR AUMENTO DE ESTRÉS OXIDATIVO: INTERACCIONES CON OTROS FACTORES PATOGÉNICOS, presentada por Yolanda Baca Morilla, 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 10 de Diciembre de 2012

Fdo. Isabel Rodríguez Gómez





Los resultados de esta Tesis Doctoral han parcialmente publicados en:

- Role of Sympathetic Tone in BSO-Induced Hypertension in Mice . *Am J Hypertens*;23:882-8. 2010.
- Cardiovascular and Renal Manifestations of Glutathione Depletion Induced by Buthionine Sulfoximine (BSO). *Am J Hypertens*.;25:629-35,2012.

El trabajo "Role of Sympathetic Tone in BSO-Induced Hypertension in Mice", ha sido objeto de la realización de la Editorial: Chronic Oxidative Stress and Sympathetic Vasomotor Tone in Arterial Hypertension. *Am J Hypertens*.; 23: 820. 2010



El doctorando Dña. Yolanda Baca Morilla y los directores de la tesis D. Félix Vargas Palomares, D. Antonio Osuna Ortega y Dña. Isabel Rodríguez Gómez, Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 11 de Diciembre de 2012

Director/es de la Tesis

Fdo.: Félix Vargas Fdo.: Antonio Osuna Fdo.: Isabel Rodriguez

Doctorando

Fdo.: Yolanda Baca



*A mi hija Lola.  
A Luis y Primitiva,  
los años vividos han  
sido pocos pero intensos.*



## AGRADECIMIENTOS

Cuando en una guardia, Antonio me propuso hacer un experimento con animalitos y así intentar hacer algo interesante, jamás me esperaba, que esto terminase así, ni que fuese un camino tan duro, tan largo y con tantas curvas.

A los directores de esta tesis, D. José Félix Vargas Palomares, D. Antonio Osuna Ortega y Dña. Isabel Rodríguez Gómez, por haberme guiado en todo momento, por su dedicación y trabajo, por animarme a seguir adelante, y por llevar a cabo este proyecto.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Granada, a la Unidad Experimental del Hospital Virgen de las Nieves , y a todo su personal, por la elaboración de esta tesis y por todos los buenos momentos allí pasados.

A Isa, por sus ánimos constantes, por su ayuda "bibliográfica", por los momentos de risas, por las tardes en el laboratorio, por los desayunos juntas, por las confidencias. A Rocío, por lo pesada que ha sido, recordándome casi a diario, que tenía que finalizar este proyecto. A Juanma, por darme los primeros consejos del mundo del laboratorio.



Al Servicio de Nefrología del Hospital Virgen de las Nieves, por la formación recibida de todos y cada uno de ellos, en especial al Dr. Antonio Osuna y Dr. Juan Bravo por ser referentes para mí en mi afán de superación. Jamás podré olvidar que mis comienzos como médico fueron a vuestro lado. Gracias por lo que me habéis enseñado.

Al mi actual servicio, de Anestesiología y Reanimación del Complejo Hospitalario de Jaén, por haber tenido "la culpa" de atrasar mi trabajo, han sido muchas las horas en las que he tenido que dejar a un lado este trabajo para intentar estar a la vuestra altura. ¡Gracias Antonio! ¡Gracias Ángela! ¡Gracias Amparo!

A mi familia, por estar siempre a mi lado en cada uno de los proyectos en los que me he embarcado a lo largo de mi vida, espero que siempre estéis ahí. A Claudia y María, sin los plátanos mis ratoncillos hubiesen muerto de hambre. A mi marido Jose, por su apoyo en los ratos que su jardín se lo permitía, por sus ánimos en los bajos momentos, por sus paseos al ordenador "solo a ver como ibas", por el "minúsculo" sacrificio que ha hecho conmigo. A mi madre, por tener la mesa preparada cada día para no perder tiempo, por apoyarme en todo momento, por pasar interminables horas con mi hija, y a mi padre, por ser un padre ejemplar, y por tener esa sonrisa entre dientes cada vez que consigo una meta, sé que estas orgulloso de mí, pero, ino seas

tan hipocondríaco por favor! A ambos agradeceros todos los encargos que me habéis hecho, por darme sabios consejos, por no dejar que abandonase en ningún momento, por quererme como me queréis y por darme la posibilidad de estudiar Medicina y realizar esta tesis. A mi hermana Rosa, por estar dispuesta en todo momento a echarme una mano y por hacer maravillosos potitos. Y en último lugar, a mi hija Lola, pedirle perdón por las horas que le he robado en los primeros meses de vida para dedicárselos a este, mi sueño.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

Ach: Acetilcolina

ACr: Aclaramiento de creatinina

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADP: Adenosín-difosfato

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico

Ang II: Angiotensina II

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AT1: Angiotensina 1

AT1R: Receptor tipo 1 de la Angiotensina 1

BSO: SR-L butionina sulfoximina

CAT: Catalasa

CMLV: Célula del músculo liso vascular

DETC: Dietilditiocabamico

DM: Diabetes mellitus

DOCA: Desoxicorticosterona

DR1: Receptor dopaminérgico tipo 1

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

E.E.M: Error estándar de la media

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ET: Endotelina tisular

FC: Frecuencia cardiaca

FSR: Flujo sanguíneo renal

GC: Guanilatociclasa

GCS: Gamma-glutamilcisteina sintasa

GFR: Tasa de filtrado glomerular

GMPc: Guanosín-monofostato cíclico

GPX: Glutation-peroxidasa

GR: Glutation-reductasa

GRK-2: Receptor membranosokinsa-2

GSH: Glutation

GSSG: Glutación oxidado

HTA: Hipertensión arterial

IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IL-1: Interleuquina 1

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IRC: Insuficiencia Renal Crónica

L-NAME: N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginina-metil-éster

L-NMMA: N<sup>G</sup>-mono-metil-L-arginina

NA: Noradrenalina

NADPH: Nicotín adenina dinucleótido fosfato

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPasa: Bomba sodio/potasio/ATPasa

NF-κβ: Factor nuclear κβ

NHE3: Intercambiador renal de Na<sup>+</sup>/H<sup>-</sup> tipo 3

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOx: metabolitos del oxido nítrico en orina

NPS: Nitroprusiato sódico

PA: Presión arterial

PAM: Presión arterial media

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PC: Peso corporal

PCF: Peso corporal final

Pc: Peso corazón

P.Dif.: Presión diferencial

Phe: Fenilefrina

PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina I<sub>2</sub>

PKC: Proteina kinasa C

PP: Presión de pulso

PR: Peso del riñón

PRZ: Prazosín

PS: Presión sanguínea

PVI: Peso ventricular izquierdo

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RVLM: Medula ventrolateral rostral

SHRs: Ratas espontáneamente hipertensas

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SNS: Sistema nervioso simpático

SNSR: Sistema nervioso simpático renal

SOD: Superóxido dismutasa

SRA: Sistema renina-angiotensina

T<sub>3</sub>: Triyodotironina

T<sub>4</sub>: Tiroxina

THS: Hormona tiroestimulante

TP: Túbulo proximal

TD: Túbulo distal

TC: Túbulo colector

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

VC: Vasoconstrictor/ Vasoconstricción

VD: Vasodilatador/Vasodilatación

VI: Ventrículo izquierdo





*"Donde quiera que se ama el arte de la  
medicina se ama también a la humanidad."*

*Platón.*



**ÍNDICE**





---

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. ESTRÉS OXIDATIVO E HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....</b>	<b>3</b>
<b>2. METABOLISMO DEL GLUTATION Y BSO.....</b>	<b>9</b>
2.1. Síntesis de GSH.....	10
2.2. Funciones del GSH.....	12
2.3. Inhibidores de GSH.....	12
<b>3. MODELO ANIMAL DE HIPERTENSION INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO.....</b>	<b>13</b>
<b>4.EFECTOS CARDIOVASCULARES Y RENALES POR DISMINUCION DE GLUTATION POR TRATAMIENTO CON BSO.....</b>	<b>15</b>
4.1. Efectos en la presión arterial.....	15
4.2. Efectos del BSO sobre la frecuencia cardiaca.....	16
4.3. Efecto del BSO en la hipertrofia cardiaca y renal.....	17
4.4. Efecto del BSO sobre la reactividad vascular.....	18
4.5. Efecto del BSO sobre los agentes vasoactivos.....	21
4.6. Tono simpático.....	23
4.7. Función renal, natriuresis y sistema dopaminergico.....	27
<b>5. EFECTOS DEL DETC ( INHIBIDOR DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA) SOBRE LA PA.....</b>	<b>29</b>

<b>6. EFECTOS DE LA DISFUNCIÓN TIROIDEA SOBRE LA PA Y EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN.....</b>	<b>33</b>
6.1. Efectos hemodinámicos del hipertiroidismo.....	33
6.2. Papel del estrés oxidativo en las manifestaciones renales y cardiovasculares del hipertiroidismo.....	34
<b>II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Fármacos e instrumentos utilizados.....</b>	<b>45</b>
1.1. Fármacos.....	45
1.2. Instrumento.....	46
<b>2. Métodos experimentales.....</b>	<b>47</b>
2.1. Animales y distribución.....	47
2.2. Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía en rabo.....	50
2.3. Cateterización de la arteria carótida y vena yugular.....	51
2.4. Medida de la presión arterial y frecuencia cardíaca por registro directo.....	52

---

<b>3. Protocolos experimentales.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Experimento I.</b> Efectos de la administración crónica de dosis crecientes de BSO a los ratones normotensos.....	53
<b>3.2. Experimento II.</b> Efectos del bloqueo alfa adrenérgico de modo crónico sobre la presión arterial, función renal y otras variables de la hipertensión arterial inducida por estrés oxidativo.....	55
<b>3.3. Experimento III.</b> Evaluación de la contribución del sistema nervioso simpático sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca en la hipertensión inducida por estrés oxidativo.....	56
<b>3.4. Experimento IV:</b> Efecto de la inhibición de la SOD en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.....	57
<b>3.5. Experimento V:</b> Efecto de la inducción del hipertiroidismo en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.....	58
<b>4. Procedimientos analíticos.....</b>	<b>59</b>
4.1. Determinación de proteínas, electrolitos, urea, creatinina.....	59
4.2. Determinación de hormonas tiroideas.....	59
4.3. Determinación de isoprostanos F2.....	60
4.4. Determinación hepática de GSH.....	60
4.5. Determinación de niveles plasmáticos de noradrenalina.....	61

<b>5. Estudio histopatológico.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Análisis estadísticos.....</b>	<b>62</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>1. Experimento I: Efectos de la administración crónica de dosis</b>	
crecientes de BSO a los ratones normotensos.....	67
1.1. Presión arterial sistólica.....	67
1.2. Frecuencia cardiaca.....	69
1.3. Variables morfológicas.....	71
1.4. Variables metabólicas.....	72
1.5. Variables plasmáticas.....	73
1.6. Variables urinarias.....	73
1.7. Hormonas tiroideas.....	74
1.8. Contenido de Glutation hepático en el grupo tratado con BSO-10.....	74
1.9. Noradrenalina plasmática.....	75
1.10. Excrección urinaria de Isoprostanos F2a.....	76
1.11. Niveles de Isoprostanos F2a en tronco de encefalo.....	77

---

<b>2. Experimento II:</b> Efectos del bloqueo alfa adrenérgico de modo crónico sobre la presión arterial, función renal y otras variables de la hipertensión arterial inducida por estrés oxidativo.....	78
2.1. Presión arterial sistólica y frecuencia cardíaca.....	78
2.2. Variables morfológicas.....	79
2.3. Variables metabólicas.....	81
2.4. Variables plasmáticas.....	82
2.5. Variables urinarias.....	83
<b>3. Experimento III:</b> Evaluación de la contribución del sistema nervioso simpático sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca en la hipertensión inducida por estrés oxidativo.....	85
3.1. Respuesta hemodinámica al bloqueo angliolar.....	85
<b>4. Experimento IV:</b> Efecto de la inhibición de la SOD en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.....	87
4.1. Presión arterial y frecuencia cardíaca.....	87
4.2. Variables morfológicas.....	88
<b>5. Experimento V:</b> Efecto de la inducción del hipertiroidismo en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.....	89
5.1. Variables hemodinámicas.....	89
5.2. Variables morfológicas.....	90



V. DISCUSIÓN.....	91
VI. CONCLUSIONES.....	109
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	113

*"Las fuerzas naturales que se encuentran dentro  
de nosotros son las que verdaderamente  
curan las enfermedades."  
Hipócrates*



**VICCIÓN**



## 1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO

El aumento del estrés oxidativo se ha demostrado en modelos animales con hipertensión espontánea (genéticos) (Schnackenberg et al. 1999; Duarte et al., 2001) y en modelos experimentales de hipertensión, como la inducida por angiotensina II (Ang-II) (Kopkan et al., 2006), DOCA (Galisteo et al., 2004), hipertensión inducida por intoxicación con plomo (Vaziri et al., 1997), por T4 (Moreno et al., 2005), y por la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Sainz et al., 2005). A diferencia de lo que ocurre en los modelos animales, la asociación entre el estrés oxidativo y la hipertensión en humanos es menos consistente, y los resultados varían en función del marcador de daño oxidativo investigado (Ward et al., 2006).

El aumento del estrés oxidativo se ha observado en hipertensiones secundarias a enfermedades, como en el caso de la insuficiencia renal. En insuficiencia renal crónica (IRC) e hipertensión, hay asociado un aumento del estrés oxidativo y reducción en la disponibilidad del óxido nítrico (NO) tisular (Vaziri et al., 1998). En este tipo de hipertensión, las medidas que mejoran el estrés oxidativo, aumentan la disponibilidad del NO y mejoran la hipertensión urémica (Vaziri et al., 2002), apoyando la

idea de que el estrés oxidativo contribuye a la patogénesis de la hipertensión arterial urémica.

Se ha demostrado, en experimentos *in vitro*, que las especies reactivas de oxígeno (ROS), resultado del metabolismo celular, aparte de producir daño celular, actúan como mediadores en la vasoconstricción (VC), y al bloquear la producción de ROS, se atenúa el aumento de la presión arterial (Landmesser et al., 2002).

Hay estudios, en modelos animales de hipertensión, que demuestran que los antioxidantes pueden reducir la presión arterial (Schnackenberg et al., 1999; Duarte et al., 2001; Kopkan et al., 2006; Galisteo et al., 2004; Vaziri et al., 1997; Moreno et al., 2005; Sainz et al., 2005), aunque, hay otros que no demuestran esta asociación (Zhang et al., 2004; Elmarakby et al., 2005). La disminución del estrés oxidativo, con antioxidantes, reduce la inactivación del NO mediado por las ROS, aumentando la disponibilidad de este y atenuando la presión arterial (Vaziri et al., 1999). En estudios en humanos, la terapia con fármacos antihipertensivos, como los bloqueantes de los receptores tipo 1 de angiotensina (AT1R) (Chamorro et al., 2004) o los antagonistas del calcio

(Taddei et al., 2003), además de reducir la presión arterial, parecen tener efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo.

Clásicamente, la Ang-II es conocida como un agente vasoactivo que participa en la regulación hemodinámica sistémica y local, y es considerada como una citokina verdadera. La Ang-II tisular juega un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca y en el daño renal (fibrosis renal) de la hipertensión (Morgan et al., 1991; Mezzano et al., 2001) junto a la endotelina tisular (ET) (Karam et al., 1996). La Ang-II puede contribuir al mantenimiento de la hipertensión a través de la estimulación del estrés oxidativo (Romero et al., 1999) acompañándose por un aumento de los niveles de 8-iso-prostaglandinaF2a (Isoprostano F2a) (Aizawa et al., 2002). El Isoprostano F2a es una forma no enzimática producida por el ataque de los radicales superóxido al ácido araquidónico (Roberts et al., 1997). Los isoprostanos F2a tienen gran potencia como vasoconstrictores y como antinatriuréticos (Takahashi et al., 1992). Sin embargo, la Ang-II puede cambiar la producción de ET (Kohno et al., 1992), la cual ha demostrado que estimula el estrés oxidativo (Fukunaga et al., 1995). Estas alteraciones, junto con la reducción del NO, podrían potenciar el efecto vasoconstrictor de la Ang-II y podrían explicar porqué la hipertensión se mantiene aún cuando los

niveles de Ang-II son normales (Trippodo et al., 1981). Esta secuencia de eventos parece ser que juega un papel fundamental en la patofisiología del modelo animal de ratas espontáneamente hipertensas (SHRs) (Romero et al., 1999).

El modelo SHRs, que es el modelo de hipertensión animal más parecido al humano, está caracterizado por un aumento del estrés oxidativo (Suzuki et al., 1995; Duarte et al., 2001), y por un incremento de la producción del anión superóxido que contribuye a la hipertensión (Suzuki et al., 1995). De hecho, la reducción del anión superóxido con aloxantina (inhibidor de la xantina-oxidasa) o tempol (un antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD)) (Miyamoto et al., 1996, Schnackenberg et al., 1999), disminuye de modo agudo la presión arterial media (PAM) en SHRs. La actividad plasmática de la renina y los niveles de Ang II no están incrementados en las SHRs (Trippodo et al., 1981) y existe evidencia considerable de que el sistema renina-angiotensina (SRA) juega un papel importante en la patogénesis de la hipertensión arterial en este modelo experimental. El bloqueo crónico del receptor de AT1 previene o atenúa el desarrollo de la hipertensión (Mizumo et al., 1992; Zhou et al., 2002), la hipertrofia cardíaca (Mizumo et al., 1992) y el daño renal en las SHRs (Chamorro et al., 2003).

En SHR<sub>s</sub>, es evidente el estrés oxidativo, la elevación de NADP(H) oxidasa (enzima que cataliza la reducción de oxígeno molecular y produce anión superóxido) y de isoprostanos F<sub>2a</sub> en los tejidos renales y cardiovasculares. La administración, en estos animales, de agentes antioxidantes como los flavonoides (antioxidantes presentes en las frutas y verduras) mejora la HTA y los efectos de esta en los órganos diana (Pérez-Vizcaíno et al., 2009; Galindo et al., 2012).

La hipertensión en SHR<sub>s</sub> se agrava con la administración de DOCA a una dosis que no aumenta la PA en ratas no hipertensas (De Gracia et al., 2000). Los mecanismos por los que la DOCA aumenta la PA en SHR<sub>s</sub> no están definidos. Chamorro et al. (2004), mostraron que el tratamiento con DOCA en SHR<sub>s</sub> produce aumento en los niveles de excreción urinaria de isoprostanos F<sub>2a</sub> y en los niveles de endotelina (ET) en el cortex renal, así como la no supresión de la Ang-II renal, y que la retención de sodio por los mineralcorticoides puede jugar un papel importante, pudiendo agravar el desplazamiento a la derecha de la curva de presión-diuresis-natriuresis en SHR<sub>s</sub> (Kline et al., 1994). De hecho, la administración de DOCA a las SHR<sub>s</sub> provoca una natriuresis normal con un incremento de la PA, sugiriendo un defecto en la relación de presión-natriuresis. Una de las principales observaciones que encontraron es que

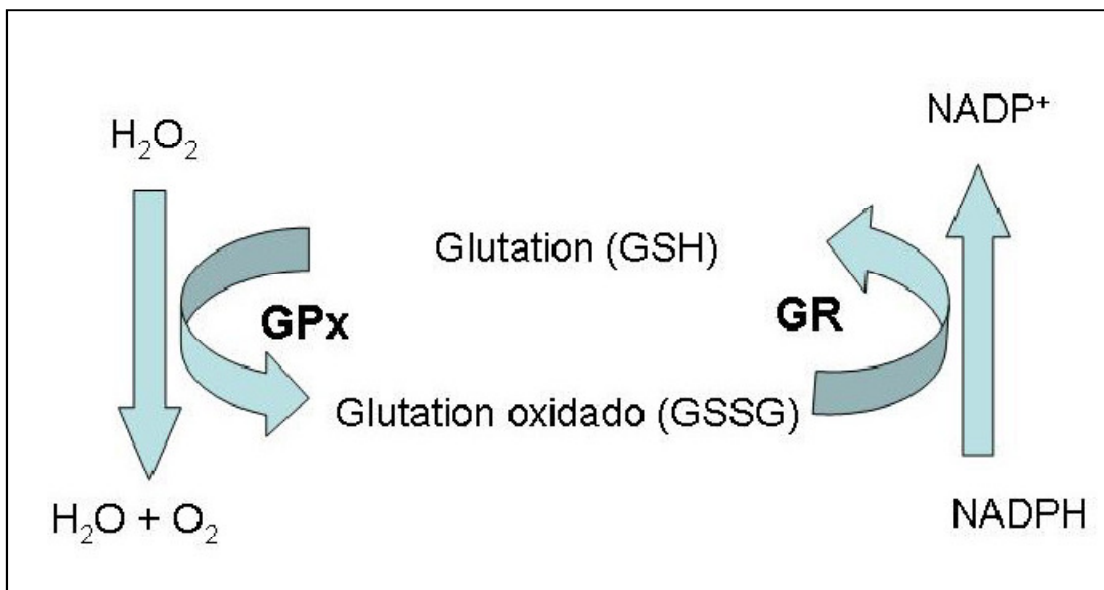


el losartán reduce la PA en el modelo de hipertensión DOCA en las SHRs. El hecho que el losartán reduzca la PA en ambos grupos (ratas SHRs DOCA y no DOCA) de modo similar, indica que este fenómeno podría ser independiente de la renina. Estos datos contrastan con la supresión del efecto antihipertensivo del losartán por la DOCA en la hipertensión inducida por inhibición del NO en ratas (De Gracia et al., 2000), y con la incapacidad reconocida del bloqueo de los receptores AT1 para reducir la PA en las ratas hipertensas DOCA-sal (Fujita et al., 1997; Kim et al., 1994), que se han encontrado por otros grupos de trabajo. El mecanismo por el cual el losartán inexplicablemente reduce la PA en las SHRs tratadas con DOCA no está claro, pero la disminución del aumento del estrés oxidativo y la reducción en los niveles renales de ET y Ang-II podría participar en este fenómeno.

## 2. METABOLISMO DEL GLUTATION Y BSO

El glutatión (*GSH*) es el tiol no proteico más abundante intracelular con múltiples funciones como agente antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1989). Actúa para eliminar las ROS, así como para regenerar otros antioxidantes a partir de sus formas oxidadas (Dhalla et al., 2000).

La mayor parte de *GSH* (85-90%) está presente en el citosol, el resto en muchas organelas (incluyendo mitocondrias, matriz nuclear, y peroxisomas) (Lu, 2000). A excepción de los ácidos biliares, que pueden contener hasta 10 mmol/L de *GSH*, las concentraciones extracelulares de *GSH* son relativamente bajas (2-20 micromol/L en plasma) (Jones et al., 2002 y Griffith et al., 1999). El *GSH* es oxidado fácilmente de forma no enzimática a disulfuro de glutatión (*GSSG*) por sustancias electrofílicas (los radicales libres y especie reactiva de oxígeno o del nitrógeno) (fig.1). Las concentraciones celulares de *GSH* se reducen en respuesta a la desnutrición proteica, el estrés oxidativo, y a muchas condiciones patológicas. La relación [*GSH*]: [*GSSG*], es de uso frecuente como indicador del estado redox.

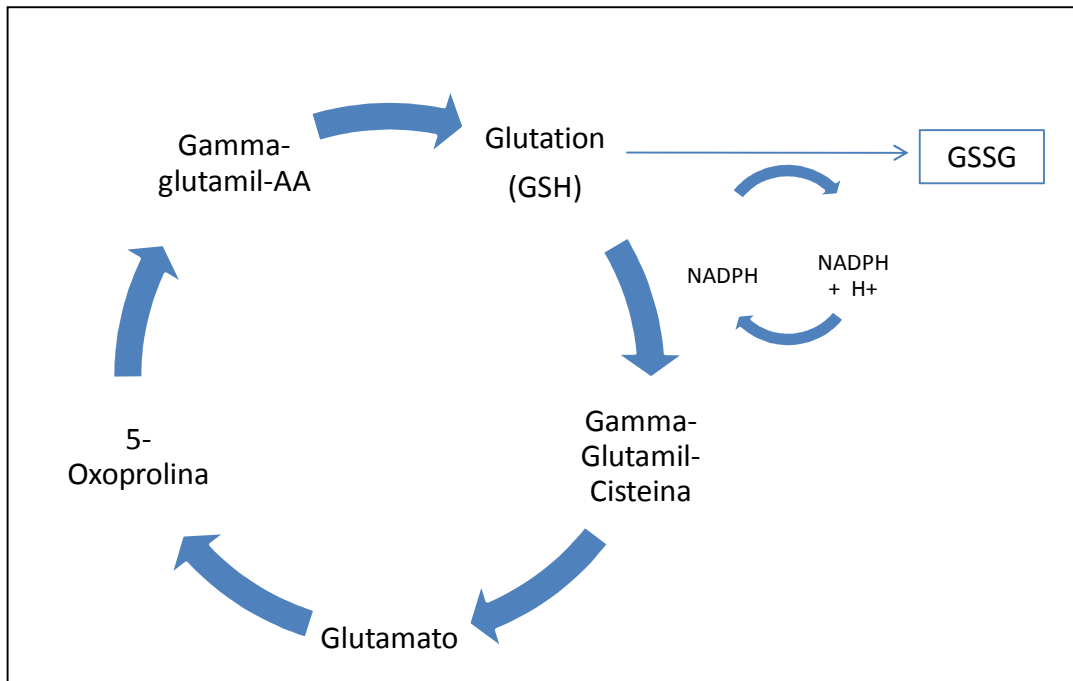


**Figura 1:** Sistema antioxidante GPx/GR.

*GPx: Glutation peroxidasa. GR: Glutation reductasa.*

## 2.1 Síntesis GSH

La síntesis de GSH desde glutamato, cisteína, y glicocola es catalizada secuencialmente por dos enzimas citosólicas, gamma-glutamilcisteina sintasa (GCS) y ligasa de GSH (fig.2). Este proceso ocurre virtualmente en todos los tipos de células, siendo el hígado el principal productor y portador de GSH.



*Figura 2. Síntesis del glutatión.*

El estrés oxidativo, el estrés nitrooxidativo, las citocinas inflamatorias, el cáncer, la quimioterapia del cáncer, la radiación ionizante, el choque de calor, la inhibición de la actividad de GCS, el agotamiento de GSH, la conjugación de GSH, la prostaglandina A2, los metales pesados, los antioxidantes y la insulina aumentan la transcripción actividad del GCS en multitud de células (Townsend et al., 2003). En cambio, la carencia de proteínas, la dexametasona, la eritropoyetina, el factor de crecimiento tumoral beta, la hiperglucemia, y la fosforilación del GCS disminuyen la transcripción o actividad del GCS. El factor kappa-

$\beta$  nuclear disminuye la expresión de GCS en respuesta al estrés oxidativo, a citocinas inflamatorias, y a la inhibición del GSH inducida por sulfoximina- butionina (BSO).

## 2.2. Funciones del GSH.

El GSH elimina directamente con eficacia los radicales libres y otras ROS (radical de hidróxido, radical peroxilipídico, peroxinitritos, y  $H_2O_2$ ) directamente e indirectamente a través de reacciones enzimáticas (Fang et al., 2002). El GSH está presente en algunas funciones vitales de los animales. Son necesarias concentraciones adecuadas de GSH para la proliferación celular, incluyendo linfocitos y células del epitelio intestinal (Aw et al., 2003). Además, el GSH es esencial para la activación de linfocitos T y de leucocitos polimofonucleares así como para la producción de citocinas, y por lo tanto para activar repuestas inmunológicas contra los desafíos inmunológicos (Cai et al., 2003).

## 2.3. Inhibidores de GSH

Aunque se conocen varios inhibidores de GCS, el más utilizado ha sido la SR-L-butionina sulfoximina (BSO). A diferencia de la metionina sulfoximina, el BSO es relativamente tóxico, su principal efecto in vivo es inhibir la GCS. Algunos estudios han demostrado la inhibición del

transporte en los riñones de *GCS* por *BSO* (Anderson y Meister 1983). La eficacia del *BSO* como inhibidor de la *GCS* se ha usado in vivo en varias aplicaciones. Se trata de un agente selectivo útil para disminuir la síntesis de *GSH*, disminuyendo los niveles de *GSH* (Meister, 1983<sup>a</sup>).

### **3. MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN-BSO INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO.**

El estrés oxidativo y la hipertensión arterial se puede producir en ratas Sprague-Dawley por la administración oral de butionina sulfoximina (*BSO*), el cual produce disminución de glutatión por inhibición selectiva de la *GCS*, que es una enzima del metabolismo del *GSH*. Este modelo de hipertensión es atenuado por la terapia antioxidante (Vaziri et al., 2002) y agravado por el aumento de ingesta salina (Banday et al., 2007), por la administración de ácido dietilditiocarbámico (*DETC*), un inhibidor de la *SOD*, y por el estado hipertiroides, los cuales aumentan el estrés oxidativo.

Grossman (2008), propuso los siguientes criterios para la identificación del estrés oxidativo como causa de hipertensión:

1.- El estrés oxidativo debe estar asociado con hipertensión.

2.- El mecanismo por el cual el estrés oxidativo causa hipertensión debe ser conocido.

3.- El estrés oxidativo puede causar hipertensión arterial en animales de experimentación.

4.- Los antioxidantes pueden disminuir la presión arterial.

De acuerdo con la evidencia disponible, la HTA inducida por BSO es un prototipo de HTA provocada por el aumento del estrés oxidativo.

En este modelo de hipertensión, se ha evaluado la contribución potencial de factores patogénicos, incluyendo la reactividad vascular, los factores derivados del endotelio, la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la producción de tromboxano A<sub>2</sub>-, PGI<sub>2</sub>, la sensibilidad al sodio, la natriuresis renal inducida por dopamina, y el tono simpático.

## 4. EFECTOS CARDIOVASCULARES Y RENALES POR DISMINUCION DE GLUTATION CON BSO.

### 4.1. Efectos en la Presión arterial

Los efectos de la administración de BSO sobre la PA que hay publicados son discrepantes. Al medir la PA por pletismografía en ratas, se ha obtenido resultados muy heterogéneos, desde incrementos marcados de la PA (alrededor de 100mmHg) (Vaziri et al., 2000; Zhou et al., 2002), incrementos menores (de unos 20mmHg) (Bayorh et al., 2003; Ganafa et al., 2004), e incluso hay algunos autores que no han encontrado modificaciones en la PA (Iwata et al., 2007). Estas discrepancias, en cuanto a las cifras de PA, también se han encontrado con mediciones de esta por registro directo. Ford et al. (2006), encontraron que la administración de BSO (20 o 30 mM en agua de bebida) no tenía efecto significativo en la presión arterial sistólica medida por registro directo en dos localizaciones diferentes (arteria femoral y carótida) en repetidas ocasiones durante más de 10 días en animales despiertos o al final del periodo de experimentación bajo anestesia. En contraste con estos datos, Banday et al. (2007, 2008) en varios estudios, observaron un modesto incremento de la PA , entre 13-23 mmHg, en ratas anestesiadas.



Todas estas diferencias son difíciles de explicar, pero no pueden ser atribuidas al método de medida de la PA, ni al tipo de animal usado (ratas Sprague-Dawley en todos los casos) ni a un efecto central del BSO que predispone a estos animales a aumentos de la PA bajo situaciones de estrés, como sugirió Ford et al. (2006).

Cualquier estímulo hipertensivo suele producir menor aumento de PA en ratones que en ratas. Así, en la mayoría de los estudios tras 4 semanas de inducción de hipertensión, la PA sistólica está alrededor de 200mmHg en el modelo de hipertensión en ratas (renovasculares y DOCA) y alrededor de 140mmHg en ratones (Ford et al., 2006). Estas observaciones deben de tenerse en cuenta para el análisis y discusión de las muestras obtenidas en ratones.

#### **4.2. Efecto en la Frecuencia cardiaca**

Los estudios llevados a cabo en este modelo animal de HTA en ratas, en cuanto a la modificación de la frecuencia cardiaca (FC) no son concluyentes. Ford et al. (2006) no encontraron modificaciones significativas con BSO en la FC a lo largo de los días de tratamiento, ni en el registro directo al final del tratamiento tras 10 días de administración. Sin embargo, Ganafa et al. (2002) observaron que la

administración de BSO a ratas Sprague-Dawley durante 24 horas producía una evolución paralela entre la FC y la presión arterial media (PAM), pero no encontraron diferencias significativas en la tasa de FC tras una semana de tratamiento. Un aumento del estrés oxidativo inducido por la administración sistémica de un inhibidor de la SOD como el DETC produce un aumento en la FC, PAM y en la actividad del sistema nervioso simpático renal (SNSR) (Shokoji et al.,2004), que es revertido por la administración sistémica de Tempol ( un mimético de la SOD) (Raij et al,1989; Shokoji et al.,2004; Chen et al.,2007). Estas observaciones sugieren que el aumento en forma dosis respuesta de la FC observada con el tratamiento con BSO puede ser secundario al aumento de la actividad simpática inducida por el aumento de estrés oxidativo.

#### **4.3 Efecto en la Hipertrofia cardiaca y renal**

En humanos la adaptación cardiaca a la hipertensión, produce hipertrofia concéntrica secundaria a la elevación de las resistencias vasculares periféricas y al aumento de la carga ventricular. La hipertrofia cardiaca es la base del desarrollo de patologías cardiacas como la insuficiencia cardiaca y de trastornos del ritmo, que explican la

alta tasa de muerte súbita de origen cardiaco en los pacientes hipertensos.

En este modelo de hipertensión en ratas, tras 10 días de tratamiento con BSO a dosis de 20 o 30 mmol/L, Ford et al. (2006), no observaron hipertrofia cardiaca como se esperaba. Sin embargo, Johns et al. (1996), observaron inesperadamente que los ratones con HTA renovascular o DOCA-sal no desarrollaban hipertrofia cardiaca tras 4 semanas de inducción de la hipertensión, en contraste con la hipertrofia encontrada en este modelo de hipertensión en ratas. Todos estos hallazgos sugieren que los ratones tienen una sensibilidad disminuida a desarrollar hipertrofia cardiaca.

#### **4.4 Efecto sobre la Reactividad vascular**

La depleción de GSH inducido por BSO provoca disfunción vasomotora por el estrés oxidativo. Sin embargo, hay resultados contradictorios sobre su capacidad de respuesta a vasoconstrictores (VC) o vasodilatadores (VD) endotelio-dependientes o independientes.

Ganafa et al. (2002) encontraron una mayor capacidad de respuesta de la presión sanguínea, con un aumento de PA y una reducción de la FC a fenilefrina a las 24 horas de la administración de BSO. Del mismo modo, Ford et al. (2006) vieron que a los 10 días de tratamiento con BSO, se produce un aumento en la sensibilidad y máxima respuesta vasoconstrictora en anillos aórticos a la fenilefrina, pero no encontraron diferencias en la curva dosis-respuesta a KCl entre el grupo BSO y grupo control. Sin embargo, Banday et al. (2007), en estudios similares, no encontraron diferencias en la vasoconstricción máxima en anillos aórticos con fenilefrina o KCl en ratas tratadas con BSO durante 12 días.

Los estudios in vitro sobre la depleción aguda de GSH, muestran una reducción de la relajación inducida por NO y por Acetilcolina (ACh) en anillos aórticos de conejos (Adachi et al., 2000). Laursen et al. (2001) en un estudio in vivo, demostraron que el BSO, administrado intraperitoneal durante 24 h, disminuye el efecto hipotensor de la Ach en un 30%, y el efecto del deterioro de Ach se asoció a una reducción significativa en la actividad de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Estos autores concluyeron que la depleción de GSH produce disfunción endotelial y reducción de la relajación vascular, causado por la disminución en la formación de NO endotelial. En un estudio in vitro de

Ford et al. (2006) observaron que la relajación Ach-endotelio-dependiente es significativamente menor en anillos aórticos de las ratas tratadas con BSO. Del mismo modo, Banday et al. (2007) demostraron que en anillos de aorta torácica de ratas tratadas con BSO durante 12 días, había una disminución en la respuesta vasodilatadora endotelio-independiente y que el tratamiento con alto contenido en sal junto a BSO, producía una disminución de la respuesta a los agonistas endotelio-dependientes (Ach, ADP y ionóforo de calcio A23187). En contraste con las anteriores observaciones, Iwata et al. (2007) vieron que la vasodilatación inducida por Ach es significativamente mayor en los anillos aórticos de ratas tratadas con BSO (30 mmol/l en agua de bebida durante 7 días), en comparación con las ratas control. Los autores confirmaron que la expresión de eNOS es más abundante en las ratas tratadas con BSO en comparación con las ratas control y sugieren que el desacoplamiento de la eNOS puede contribuir a la producción de radical superóxido que se dismuta a  $H_2O_2$  como resultado de la actividad de SOD, mejorando así la relajación vascular. El carácter contradictorio de estos datos impide una conclusión definitiva de la función endotelial tras la administración de BSO.

Ganafa et al. (2002) describieron una respuesta atenuada endotelio-independiente al nitroprusiato de sodio (NPS) a las 24 horas de la administración de BSO. En contraste, Ford et al. (2006) e Iwana et al. (2007) mostraron una relajación similar endotelio-independiente al nitroprusiato sódico entre aortas de ratas del grupo control y BSO, demostrando que la respuesta del músculo liso vascular al NO no se afecta por este tratamiento. Teniendo en cuenta lo conocido hasta ahora, el estrés oxidativo puede estar implicado en la disfunción vasomotora inducida por BSO, y estar involucrada en la génesis del efecto hipertensivo del BSO. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para aclarar este tema.

#### **4.5. Efectos sobre los agentes vasoactivos.**

Varios estudios han demostrado que en las ratas tratadas con BSO (Vaziri et al., 2000; Ganafa et al., 2002; Zhou et al., 2002), existe una reducción plasmática y en la excreción urinaria de los metabolitos del NO, nitratos y nitritos (NO<sub>x</sub>), lo que se traduce en una menor disponibilidad de NO. En los animales tratados con BSO no hay diferencias significativas ni en la actividad ni concentración de eNOS e iNOS renales (Zhou et al., 2002), mientras que en la aorta si hay

mayores niveles de eNOS (Banday et al., 2007; Iwata et al., 2007). Estas observaciones sugieren que la hipertensión inducida por estrés oxidativo no es causada por anomalías estructurales o de la expresión de la NOS en los vasos renales. En cambio, está asociado con una mayor inactivación renal del NO por las ROS y disminución de la biodisponibilidad de NO.

Ganafa et al. (2002) demostraron que la administración aguda de BSO disminuye la concentración plasmática de prostaciclina a las 8 y las 24 h de la administración de este, mientras que el NO se reduce a las 24 h., y el tromboxano A<sub>2</sub> se incrementa tanto en el plasma como en aorta a las 24 h. Este grupo también observó que la administración crónica de BSO (durante 1 ó 2 semanas) incrementa isoprostanos, y tromboxano A<sub>2</sub>, y reduce la PGI<sub>2</sub> y el AMPc (Bayorh et al., 2003; Ganafa et al., 2004), resultados que indican que la administración de BSO reduce los agentes vasodilatadores y aumenta los agentes vasoconstrictores.

En ratas tratadas crónicamente con BSO (BSO, 30 mmol / L durante 2 semanas en agua de bebida) se muestra un aumento de los niveles plasmáticos de angiotensina II, mientras que la administración de losartán, un bloqueante AT<sub>1</sub>, revierte los efectos del BSO en cuanto a la elevación de la PAM, de tromboxanos A<sub>2</sub> y de superóxido y la reducción

de las prostaciclina y los niveles de AMPc en aorta (Bayorhn et al., 2003). El tratamiento con BSO también causa un aumento de los receptores AT1 del túbulo proximal renal (TP) (Banday et al., 2008). Recientemente , estos autores observaron que la incubación de túbulo proximales renales con angiotensina-II produce aumento significativo de la activación de NHE3 en ratas tratadas con BSO frente al grupo control, indicando que el estrés oxidativo exagera la señal de angiotensina II, produciendo sobre-estimulación de NHE3 renal y contribuyendo al aumento en la presión sanguínea (Banday et al., 2011). Todos estos datos sugieren que el SRA tiene un papel importante en este tipo de hipertensión.

#### **4.6. Tono Simpático**

Existen múltiples evidencias de una modulación anormal del SNS en el desarrollo de HTA en humanos (Fujita et al., 1998) y animales (Koepke et al., 1985). La actividad de SNS esta aumentada en las ratas SHR y en las ratas Dahl-Sal (Koepke et al., 1985, Ono et al., 1997 y Leenen et al., 2002), mientras que el bloqueo alfa-1 adrenérgico con prazosin produce un marcado descenso de la presión arterial en ratas hipertensas con deficiencia en NO (Wangensteen et al., 2002).



Se ha descrito que las ROS estimulan el SNS central y periférico (Zanzinger et al., 2000; Campese et al., 2004). Las ROS neurales juegan un papel importante en la función cardiovascular. Una alteración de la regulación de los mecanismos redox centrales, pueden estar implicados en la insuficiencia cardiaca y en la hipertensión, ambas caracterizadas por la activación del SNS (Lidley et al., 2004, Zimmerman et al., 2002). Entre los órganos diana de la HTA, el cerebro es el más afectado por el estrés oxidativo (Ohtsuki et al., 1995; Kimoto-Kinoshita et al., 1999) y existen evidencias acerca de que el estrés oxidativo en el tronco del encéfalo tiene un papel clave en la patogénesis de los mecanismos neuronales de la hipertensión (Hirooka et al., 2008). La medula ventrolateral rostral (RVLM), también conocida como medula presora, es el centro vasomotor que determina la actividad nerviosa simpática basal (Dampney et al., 1994). Las ROS están aumentadas en dicha zona medular en SHRs y contribuyen a los mecanismos neuronales de dicho tipo de hipertensión (Kishi et al., 2004). En la hipertensión renovascular, se ha detectado aumento del estrés oxidativo en la RVLM y en los núcleos hipotalámicos paraventriculares (Olivera-Sales et al., 2008, 2009).

En varios estudios se ha visto que el efecto hipotensor del *tempol*, un mimético de la SOD, está acompañado de una reducción en la actividad

nerviosa simpática (Raij et al., 1989, Shokoji et al., 2004; Chen et al., 2007; Zimmerman et al., 2002, Olivera-Sales et al., 2008). Además, la infusión, en conejos, de *Dietilditiocarbamato* (DETC) intracerebroventricular, un inhibidor de la SOD, aumenta significativamente la actividad simpática a nivel renal (SNSR) (Olivera-Sales et al., 2009). La administración sistémica de DETC en ratas aumenta la PAM, la actividad SNSR y la frecuencia cardíaca (Zhou et al., 2002). La administración local de Tempol o DETC en los nervios simpáticos renales produce una disminución o aumento de la actividad del SNSR, respectivamente (Shokoji et al., 2004). Recientemente, se ha publicado que el tratamiento crónico con vitamina C en ratas hipertensas, reduce la PA y la actividad del SNSR y aumenta la respuesta barorefleja cardíaca y renal (Nishi et al., 2010).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo aumenta el tono simpático en algunos tipos de hipertensión experimental, estos incluyen los modelos de hipertensión genética (Kishi et al., 2004), por angiotensina II (Zimmerman et al., 2003), por DOCA-sal (Olivera-Sales et al., 2008), hipertensión renovascular (Olivera-Sales et al., 2009), por obesidad (Gao et al., 2004) e hipertensión sal sensible (Nishi et al., 2010). La ingesta de sal agrava la elevación de la presión arterial y la actividad SNS durante

el desarrollo de la hipertensión en SHRs, mediada por el aumento de la generación de ROS en la RVLM (Nagae et al., 2009). Además, el efecto de disminución de la PA de algunos fármacos antihipertensivos se asocia con una reducción del estrés oxidativo a nivel cerebral (Koga et al., 2008; Xue et al., 2008; Kishi et al., 2003). En conjunto, estas observaciones sugieren un papel importante de la activación del sistema nervioso simpático para la hipertensión provocada por aumento del estrés oxidativo.

El aumento del estrés oxidativo ha demostrado ser un mecanismo importante que conlleva a un deterioro del control reflejo de la circulación en hipertensión experimental (Nishi et al., 2010).

El mecanismo por el cual el estrés oxidativo puede aumentar el tono simpático en los animales tratados con BSO no está completamente claro. La producción local de ROS parece ser mediada por la activación del SNS en el cerebro, y el aumento de la producción de ROS puede activar el SNS a través de la activación/inactivación del NO (Campese et al., 2010). En las ratas Sprague-Dawley, los miméticos de la superóxido dismutasa (SOD), aumentan el contenido neuronal de óxido nítrico sintasa en los núcleos cerebrales para el control noradrenérgico de la PA (Ye et

al., 2006). Estas observaciones, junto a que los animales tratados con BSO tienen reducidos los niveles en plasma y en orina de los metabolitos del NO (Vaziri et al., 2000; Bayorh et al., 2003; Ganafa et al., 2002), sugieren que el incremento de la actividad del SNS producida por la administración de BSO puede estar relacionada con la disminución de la biodisponibilidad de NO debido a la inactivación de este por las ROS.

#### **4.7. Función renal, natriuresis y sistema dopaminérgico.**

La concentración de creatinina sérica, el aclaramiento de creatinina y la excreción de proteínas urinarias son similares entre los animales tratados con BSO y los controles (Vaziri et al, 2000; Zhou et al, 2002; Banday et al, 2007). No se han encontrado anomalías morfológicas en los riñones de las ratas tratadas con BSO (Vaziri et al., 2000; Zhou et al., 2002; Banday et al., 2007). Estas observaciones pueden sugerir que el estrés oxidativo por sí solo no puede inducir la enfermedad renal y / o anomalías estructurales en el riñón, al menos en el periodo analizado en estos estudios (<5 semanas). Sin embargo, se ha demostrado que el pretratamiento con BSO podría exacerbar la toxicidad renal por mercurio en ratas (Xu et al., 2007).

La dopamina renal juega un papel muy importante en la regulación de la homeostasis del sodio, en la PA y en la regulación de la función renal a través de la activación de los receptores D1. Se ha demostrado la existencia a nivel renal de síntesis de dopamina y de subtipos de receptores. La dopamina actúa a través de receptores de superficie celular acoplados a proteínas *G* ligadas a la estimulación de la adenil-ciclasa. La activación de los receptores like-D1 en los túbulos proximales inhibe la reabsorción tubular de sodio mediante la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  y de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ . Existen estudios que demuestran la producción defectuosa de dopamina renal y / o la disfunción del receptor de dopamina en la hipertensión esencial humana y en modelos genéticos de animales de hipertensión (Araki et al., 2009; Chan et al., 2009).

El tratamiento con BSO (a dosis de 30 mmol / l durante 2 semanas en agua de bebida), se acompaña de una alteración del acoplamiento de los receptores D1-proteína *G* y de la pérdida de la respuesta natriurética a SKF38393, un agonista de los receptores D1. El tratamiento con BSO también aumentó la traslocación nuclear del  $\text{NF-}\kappa\beta$ , la actividad y la expresión de la proteína quinasa *C*, la traslocación membranosa del acoplamiento proteína *G* al receptor quinasa-2 (GRK-2) y la fosforilación

del receptor D1 (Banday et al., 2007). En las ratas tratadas con BSO, la administración de tempol reduce el estrés oxidativo, normaliza la PA, y restaura el acoplamiento del receptor D1-proteína G y la respuesta natriurética a SKF38393. La administración concomitante de BSO (30 mmol / l durante 12 días en agua de bebida) y alta ingesta de sal causa estrés oxidativo, disfunción del receptor D1, y un marcado incremento en la presión arterial (Banday et al., 2007). Aunque la producción de dopamina renal aumenta, no logra reducir la actividad basal de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. El tratamiento con BSO y alta ingesta de sal en ratas junto a la administración de tempol disminuye el estrés oxidativo y restaura la inhibición de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa mediado por agonistas tanto exógenos como endógenos del receptor D1 y normaliza la PA.

## **5. EFECTOS DEL DETC (INHIBIDOR DE LA SOD) SOBRE LA PA.**

El DETC (dietiltiocarbamato), es un inhibidor de la SOD. El modelo de hipertensión por DETC se caracteriza por un aumento de estrés oxidativo. El aumento de los niveles de anión superóxido se cree que contribuyen a la hipertensión en ratas tratadas con DETC (Grunfeld et al., 1995; Suzuki et al., 1995). La reducción de actividad de la SOD en la

médula renal por la infusión intersticial medular de DETC provoca un incremento de la concentración medular de anión superóxido, una reducción del flujo sanguíneo en la médula renal y un aumento sostenido de la presión arterial (Makino et al., 2002).

Se han examinado los efectos de la administración sistémica de DETC, y se ha visto que provoca un aumento de la PAM, FC, y de la actividad del sistema nervioso simpático (Shokoji et al., 2004). También se han estudiado los efectos de la administración local de DETC sobre la actividad del SNSR en ratas anestesiadas administrándolo directamente a los nervios simpáticos renales y se ha observado un aumento de la actividad simpática dosis-dependiente, siendo significativamente mayor en ratas con hipertensión espontánea que en ratas normotensas (Makino et al., 2002). Con el uso de un bloqueante de los canales de potasio, disminuye significativamente la actividad simpática basal y se bloquea por completo el aumento de la actividad inducida por DETC, sugiriendo que las ROS tienen un papel importante en la regulación de la actividad periférica del SNS, y que al menos parte de este mecanismo está mediado a través de los canales de potasio voltaje-dependientes. Aún no están claros los mecanismos de generación de ROS en los nervios periféricos (Shokoji et al., 2004).

La médula renal es particularmente sensible al estrés oxidativo, debido a que la médula externa es muy rica en nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) oxidasa y en enzimas mitocondriales que producen ROS (Nakamura et al., 2002). Estudios en ratas anestesiadas también reveló que los incrementos agudos medulares de las concentraciones de radical superóxido por el uso de DETC, produce una reducción significativa del flujo sanguíneo medular, efectos que son prevenidos por la administración del antioxidante con Tempol (Nakamura et al., 2002). En una serie de estudios se ha demostrado que las reducciones crónicas del flujo sanguíneo medular pueden conducir a la hipertensión (Cowley et al., 1997). Lo que queda por determinar es si el aumento del estrés oxidativo en la médula renal daría lugar a una reducción del flujo sanguíneo medular y conducir a la hipertensión crónica.

**→Estrés oxidativo en la médula renal. Radical superóxido y función renal.**

En respuesta a la administración crónica medular de DETC se produce un aumento de los niveles tisulares de radical superóxido a nivel renal. Un trabajo llevado a cabo por Ortiz et al., (2001) muestra que el anión superóxido podría estimular la absorción de NaCl en la rama gruesa del



asa de Henle. Se ha demostrado que el anión superóxido podría actuar directamente incrementando el tono vascular en el músculo liso por aumento intracelular de calcio en las células vasculares del músculo liso (Wilcox et al., 2002). El  $O_2^-$  puede reducir la biodisponibilidad del NO en el músculo liso vascular, y por esta vía, elevar las resistencias vasculares (McIntyre et al., 1999; Vargas et al., 1999). Las ROS podrían también actuar en las vías de transporte tubular en los segmentos profundos de la nefrona y en los túbulos colectores. El  $O_2^-$  oxida el ácido araquidónico en la membrana celular y puede conducir a la generación de metabolitos que son potentes vasoconstrictores (Takahashi et al., 1993; Zou et al., 2001). El aumento de la excreción urinaria de 8-isoprostanos sugiere que productos de la peroxidación lipídica podrían participar en la reducción del flujo sanguíneo medular.

La elevación del anión superóxido en la médula renal puede tener una importante influencia en el control del flujo sanguíneo a largo plazo, y en la disfunción de los sistemas de depuración en la región medular renal y pueden producir hipertensión crónica (Makino et al., 2002).

## **6. EFECTOS DE LA DISFUNCION TIROIDEA SOBRE LA PA Y EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN.**

### **6.1. Efectos hemodinámicos del hipertiroidismo**

Las enfermedades tiroideas se conocen desde hace más de un centenar de años y son una de las patologías endocrinas más comunes en humanos y animales (Feldman et al., 1995). Las variaciones del estado eutiroideo afecta a todo el sistema fisiológico y el sistema cardiocirculatorio es el más afectado. La disfunción tiroidea está acompañada de importantes cambios hemodinámicos y en la función cardiaca (Klein et al., 1995,2001; Larsen et al., 1998). El estado hipo e hipertiroidismo provoca alteraciones en la regulación de la PA que se ve afectada tanto en humanos y animales (Klein et al., 1995, 2001; Larsen et al., 1998). Normalmente, los cambios patofisiológicos del hipertiroidismo son opuestos a lo que ocurre en el hipotiroidismo. Así, en el hipertiroidismo hay un estado de circulación hiperdinámica con aumento del gasto cardiaco, de la frecuencia cardiaca, de la presión de pulso y de la presión sanguínea y descenso de la resistencia vascular periférica, mientras el hipotiroidismo se asocia con disminución del gasto cardiaco, de la frecuencia cardiaca, de la presión de pulso y de la presión sanguínea

y elevación de las resistencias vasculares periféricas (RVP) (Klein et al., 1995, 2001; Larsen et al., 1998). El hipertiroidismo acelera mientras que el hipotiroidismo previene y revierte algunos modelos de hipertensión experimental (Vargas et al., 1988; Andrade et al., 1992). El hipertiroidismo está asociado con un incremento en el volumen sanguíneo y lo contrario ocurre en el hipotiroidismo (Graettinger et al., 1959; Celsing et al., 1986).

## **6.2. Papel del estrés oxidativo en las manifestaciones renales y cardiovasculares del hipertiroidismo.**

El estado hipertiroideo en animales está asociado con un incremento del metabolismo basal, que se conoce como calorigénesis tiroidea. El hipertiroidismo en ratas aumenta la actividad enzimática hepática que participan en el proceso de oxido-reducción, aumentando la generación de ROS (Tapia et al., 1999), y un descenso en la actividad hepática de la SOD, CAT y GSH (Fernandez et al., 2002). El desbalance entre los factores pro-oxidantes y antioxidantes produce estrés oxidativo hepático (Venditti et al., 1997).

Por otra parte, se ha demostrado recientemente que las ROS participan en la hemodinámica renal y en la excreción de sodio (Zhou et al.,

2001), y que la administración de T3 aumenta la concentración intracelular de superóxido a nivel medular renal y en el asa gruesa en las ratas Sprague-Dawley (Mori et al., 2004). Las ratas tratadas con T4, tienen una reducción significativa de la actividad de la SOD en el cortex renal y en los ventrículos cardiacos (Moreno et al., 2005). Estos hallazgos indican que la deficiencia cuantitativa de SOD intracelular en ratas hipertiroideas podría producir un aumento del estrés oxidativo renal y cardiovascular. En este contexto, Gredilla et al. (2001) demostraron que la administración crónica de T4 durante 5 semanas induce daño oxidativo lipídico, del glutation y en el DNA en el corazón del ratón.

Se ha demostrado una reducción de la actividad del CAT en el hígado (Giavarotti et al., 1998), músculo cardiaco (Asayama et al., 1989), en el riñón (Sawant et al., 2003) y en el ventrículo izquierdo de ratas hipertiroideas, pero se encontró elevada en la corteza y en la médula renal (Moreno et al., 2005). La actividad de GPX y en GR está reducida por la administración de T4 excepto en la medula renal. También se ha demostrado una reducción en la actividad de GPX en el hígado (Seymen et al., 2004), corazón (Asayama et al., 1989), y musculo esquelético (Seymen et al., 1999) de ratas tratadas con T4. Por otro lado, Sawant et al. (2003) demostraron un aumento de la actividad de GPX en el riñón de ratas

hipertiroideas. En general, estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo en el hipertiroidismo podría ser debido a la regulación a la baja de enzimas antioxidantes y este descenso podría determinar una reducida inactivación del radical superóxido, como se indica por el aumento de la excreción urinaria de isoprostanos F2a en 24horas y en los niveles plasmáticos de MDA en pacientes y en ratas tratadas con T4 (Moreno et al., 2005; Kim et al., 2004; Sewerynek et al., 2000; Venditti et al., 1997). La administración crónica con tempol atenúa el desarrollo de hipertensión en ratas hipertiroideas (Moreno et al., 2005), y reduce en plasma el MDA y la excreción total urinaria de isoprostanos F2 en ratas hipertiroideas hipertensas. Estos resultados indican que el hipertiroidismo está asociado con reducción de la actividad enzimática antioxidante en tejidos renales y cardiacas y sugiere que el estrés oxidativo participa en la hipertensión inducida por T4.

*"Del hecho de que no todos los enfermos se curan se deduce que la medicina no es un arte."*

*Cicerón*



AMIENTOS  
OBJETIVOS



El estrés oxidativo contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares incluyendo diabetes, insuficiencia renal e hipertensión arterial (HTA). Estudios experimentales en animales, han demostrado que el aumento de la presión sanguínea (PS) está asociado al aumento de estrés oxidativo, y que el tratamiento con antioxidantes disminuye la presión arterial (PA), asociado a disminución del estrés oxidativo. En el año 2000, se publicó por primera vez que el estrés oxidativo y la hipertensión arterial se podía producir en ratas Sprague-Dawley por la administración oral de BSO, el cual provoca reducción de glutatión, indicando que el estrés oxidativo puede ser la causa de la hipertensión. La contribución de varios factores patogénicos se han evaluado en el modelo animal en ratas de BSO, que es el prototipo de la hipertensión inducida por BSO, incluyendo la reactividad vascular, los factores derivados de endotelio, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la producción de tromboxano A<sub>2</sub>- Prostaglandinas H<sub>2</sub>, la sensibilidad al sodio y la natriuresis inducida por el sistema dopaminérgico.

El tono simpático juega un importante papel en el control de la (PA) (Dibona et al., 2002), y existen evidencias de una modulación deficiente del SNS en el desarrollo de HTA en humanos (Fujita et al., 1980) y animales



(Koepke et al., 1985). La actividad de SNS está aumentada en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en la Dahl-Sal (Koepke et al., 1985; Ono et al., 1997; Leenen et al., 2002). Un bloqueo alfa adrenérgico con prazosin produce un marcado descenso de la presión arterial en ratas hipertensas deficientes en óxido nítrico (Wangensteen et al., 2002). La hipertensión arterial inducida por la administración oral de BSO, induce un agotamiento del glutatión por inhibición selectiva de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa. (Vaziri et al., 2000). Las ROS estimulan el SNS central y periférico (Campese et al., 2004; Zanzinger et al., 2000) y a nivel central juegan un papel importante en la función cardiovascular, y en la alteración de la regulación de los mecanismos redox centrales pudiéndose implicar en el paro cardíaco y la hipertensión, (Lindley et al., 2004; Zimmerman et al., 2002). El estrés oxidativo, (Ohtsuki et al., 1995; Kimoto-Kinoshita et al., 1999) en el tronco cerebral tiene una implicación fundamental en la patogénesis de los mecanismos nerviosos de la hipertensión (Hirooka et al., 2008). La médula ventrolateral rostral (RVLM) es el centro vasomotor que determina la actividad nerviosa. Las ROS que se incrementan en el RVLM contribuye a los mecanismos neuronales de este tipo de hipertensión (Kishi et al., 2004).

Varios autores han demostrado que el efecto hipotensor de tempol, se acompaña de una reducción en la actividad nerviosa simpática (Zimmerman et al., 2002; Xu et al., 2002; Shokoji et al., 2003; Shokoji et al., 2004; Chen et al., 2007). La administración sistémica de DETC en ratas aumenta la presión arterial media, frecuencia cardíaca (FC), y RSNA (Shokoji et al., 2003). Por otra parte, la administración local de tempol o DETC en los nervios simpáticos renales tiene como resultado la disminución o aumento dosis-dependientes de la actividad integrada del sistema nervioso simpático renal, respectivamente (Shokoji et al., 2004).

Con estos antecedentes, los objetivos de esta tesis fueron:

1.- En primer lugar se decidió adaptar el modelo animal de hipertensión por BSO a ratones, a pesar de las dificultades técnicas de la manipulación de los diminutos órganos y vasos sanguíneos, ya que el uso de los ratones en lugar de ratas reduce el costo de los experimentos de por el alto precio de BSO. Este modelo también permite una mejor comparación con los ratones transgénicos y genéticamente iguales de amplio uso en la actualidad.

2.- Los datos previos apoyan la idea de que el estrés oxidativo regula el tono simpático, pero su contribución a la patogénesis de la hipertensión inducida por estrés oxidativo no ha sido evaluado. Por lo tanto, el objetivo

principal de este estudio fue investigar el papel del tono simpático en la hipertensión inducida por BSO en ratones, la evaluación de los efectos sobre los animales del bloqueo  $\alpha$ 1-adrenérgico crónico con prazosin y del bloqueo ganglionar agudo con pentolinium.

3.- Se investigaron los efectos presores de la inhibición de la SOD, por medio de la administración sistémica de DETC, otro agente desencadenante de estrés oxidativo. Además, se analizó el efecto conjunto de DETC y BSO sobre la presión arterial en ratones.

4.- Se analizó el efecto modulador de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo de hipertensión inducida por BSO, debido al importante papel de estas hormonas en el metabolismo basal y en la generación de radicales libres.

*“Casi todos los hombres mueren de sus medicinas, no de sus enfermedades.”*

*Molière*



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. FÁRMACOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

### 1.1 Fármacos

Ácido clorhídrico Tris.

Butionina sulfoximina (BSO).

Cloroformo (Sigma).

DETC.

Equitesina.

Etanol.

Etil éter.

Formaldehído.

Heparina sódica.

NaCl.

NaOH.

Prazosin.

Pentolinium(Sigma).

Salino isotónico.

Suero salino heparinizado.

Tampón acetato.

Tampón salino tribásico.

Tiroxina (Merck).

## **1.2. Instrumentos**

Autoanalizador Beckman CX4.

Balanza (Sartorius, Pacisa).

Centrífuga (Grigel).

Congelador -80°C.

Espectrofotómetro (Beckman-Coulter).

Estufa (Selecta).

Jaulas metabólicas individuales (Panlab).

Kits de radioinmunoensayo enzimático (R&D Systems).

Kits de GSH Cayman (Cayman Chemical Co).

Kits inmunoensayo ECLIA (Roche ).

Kits ELISA (IBL internacional).

Material de laboratorio.

Material quirúrgico (hilos de sutura, tijeras, mosquitos, pinzas, catéter...).

Pletismógrafo (Letica).

## **2. MÉTODOS EXPERIMENTALES.**

### **2.1. Animales y distribución.**

Para los experimentos realizados en la elaboración de esta tesis se emplearon ratones machos de la cepa CBA C57, nacidos y criados en el centro animal de la Universidad de Granada.

Los protocolos de atención de los animales y el trabajo se aprobaron y se llevaron a cabo siguiendo las normas establecidas por el Comité de Investigación Animal y Bioética de la Universidad de Granada de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para el cuidado ético de los animales.

Los ratones inicialmente, de 20-25 g de peso, fueron asignados al azar a los diferentes grupos experimentales. Todos los animales tuvieron libre acceso a la comida. La dieta de los ratones fue estándar con contenido de sodio de 0,5% (dieta de roedores toxicología, B & K, Barcelona, España) y agua ad libitum, excepto cuando se indique.



Fueron distribuidos de la siguiente forma:

**Experimento I:** Efectos de la administración crónica de dosis crecientes de BSO a los ratones normotensos.

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

**BSO-5:** Grupo tratado con BSO a 5 mM en agua de bebida. (n=8)

**BSO-10:** Grupo tratado con BSO a 10 mM en agua de bebida. (n=8)

**BSO-20:** Grupo tratado con BSO a 20 mM en agua de bebida. (n=8).

**Experimento II:** Efectos del bloqueo alfa adrenérgico de modo crónico sobre la presión arterial, función renal y otras variables de la hipertensión arterial inducida por estrés oxidativo.

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

**Prazosin:** Grupo tratado con prazosin a dosis de 10 mg/100 ml en agua de bebida. (n=8).

**BSO-10:** Grupo tratado con BSO a dosis de 10 mM en agua de bebida (n=8).

**Prazosin + BSO-10:** Grupo tratado con Prazosin a dosis de 10 mg/100 ml más BSO a dosis de 10 mM, ambas en agua de bebida(n=8).

**Experimento III:** Evaluación de la contribución del sistema nervioso simpático sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca en la hipertensión inducida por estrés oxidativo.

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

**BSO-10+ Pentolinium:** Grupo tratado con BSO a dosis de 10 mM en agua de bebida y administración aguda de pentolinium intravenoso a dosis de 10mg/kg . (n=10).

**Experimento IV:** Efecto de la inhibición de la SOD en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.

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

**BSO-10:** Grupo tratado con BSO a 10 mM en agua de bebida (n=8).

**DETC:** Grupo tratado con DETC a dosis de 10 mM en agua de bebida (n=10).

**BSO-10+ DETC:** Grupo tratado con DETC a dosis de 10 mM y con BSO a dosis de 10 mM ambas en agua de bebida (n=10).

**Experimento V:** Efecto de la inducción del hipertiroidismo en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.

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

**BSO-10:** Grupo tratado con BSO a 10 mM en agua de bebida (n=8).

**T4:** Grupo tratado con T4 a dosis de 5 µgr/ratón/ día inyectado subcutáneamente en el dorso del lomo del animal (n=12).

**BSO-10+ T4:** Grupo tratado con T4 a dosis de 5 µgr/ratón/ día inyectado subcutáneamente en el dorso del lomo del animal y con BSO a dosis de 10 mM en agua de bebida (n=12).

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

Se determina la presión arterial de forma incruenta en el rabo del ratón. 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 del ratón, de modo que quede ajustado y situado en la cara ventral del rabo junto al manguito.

Se realizan varias determinaciones sucesivas al mismo ratón (sobre unas 7 aproximadamente), y se expresa la presión sistólica como la media de los tres valores más bajos dentro de un rango de 5 mmHg. La presión arterial se determinó una vez a la semana a todos los ratones.

### **2.3. Cateterización de la arteria carótida y vena yugular.**

Tras anestesiar al ratón, se rasura la zona del cuello. Se practica una incisión longitudinal y se disecciona el paquete vasculo-nervioso, separando con cuidado la arteria y la vena del resto de las estructuras. Una vez realizada la disección de la arteria y de la vena, se pasan por debajo de cada una de ellas 3 hilos de lino. Se procede entonces a ligar distalmente y se clampa proximalmente la arteria carótida, para después realizar un pequeño corte en la pared arterial por el que se introduce la cánula. Tras hacerla

progresar aproximadamente por el interior del vaso en dirección al corazón, se inmoviliza anudándola a la pared vascular con el hilo. Para cateterizar la vena yugular se liga, se realiza igualmente un pequeño corte en la pared venosa y se introduce una cánula, por la que se administrara la medicación necesaria según el protocolo experimental.

#### **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 carótida del ratón bajo anestesia. Para ello se introducen en una jaula transparente de metacrilato, se retira el tapón que cierra la cánula de la arteria carótida 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 cardiaca. 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 I: Efectos de la administración crónica de dosis crecientes de BSO a los ratones normotensos.**

Se usaron ratones macho de la cepa CBA-C57, de un peso inicial de 20-25 gr, que fueron distribuidos al azar en los 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 administrándole BSO a través de agua potable a 5 (BSO-5), 10 (BSO-10) o 20 (BSO-20) mM. El tratamiento fue administrado durante cinco semanas. Una vez a la semana se midieron el peso corporal (PC), la presión sistólica (PAS) y la frecuencia cardíaca (FC). La PAS y la FC se midió por pletismografía en ratones no anestesiados como se describe en el apartado 2.2 (LE 5001-Pressure Meter, Letica SA, Barcelona, Espana).

Cuando el período experimental se terminó, todos los animales fueron alojados en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España), con acceso libre

a comida y agua, y sus respectivos tratamientos durante cuatro días (dos días para la adaptación más dos días de experimentación) con el fin de medir la ingesta de alimentos y el agua y de recoger muestras de orina. Se midieron el volumen de orina de veinticuatro horas, la proteinuria, la creatinina y la excreción total de sodio, potasio e isoprostanos. Los valores medios de la ingesta y de las variables urinarias obtenidos durante los dos días experimentales se utilizaron para los análisis estadísticos entre grupos.

Tras la finalización del estudio metabólico, los ratones fueron anestesiados con Equitesina (25µl/10g). Se procedió a canular la arteria carótida con un catéter de polietileno (PE-50) que contenía 100 unidades de heparina disuelta en solución estéril isotónica NaCl para el registro intraarterial de PS, FC y presión de pulso (PP) en ratones conscientes y para la extracción de muestras de sangre. El catéter se insertó subcutáneamente para sacarlo tunelizado a través de la piel en el cuello dorsal. Se midió la PS intra-arterial a las 24 h después de la implantación del catéter carotídeo. La presión arterial (PA) directa y la FC se registraron durante 60 minutos con una frecuencia de registro de 400/s (MacLab, AD Instruments, Hastings, UK). Se calculó la media de los valores de la PA y de la FC obtenidos durante los últimos 30 minutos para realizar comparaciones entre grupos. Posteriormente, se extrajeron muestras de

sangre del catéter carotídeo para la determinación de electrolitos, urea, creatinina, noradrenalina y hormonas tiroideas. Finalmente, se les extajo sangre, se sacrificaron, y se pesaron muestras de corazón y riñones. El corazón se dividió en ventrículo derecho y ventrículo izquierdo mas septo. Las muestras hepáticas fueron rápidamente recogidas, limpiadas y congelados en nitrógeno líquido, guardándose posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la medición del contenido total de glutatión.

### **3.2. Experimento II. Efectos del bloqueo alfa adrenérgico de modo crónico sobre la presión arterial, función renal y otras variables de la hipertensión arterial inducida por estrés oxidativo.**

Se utilizaron ratones de la cepa CBA C57 de peso inicial de 20-25gr repartidos en los 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 administrándole BSO a través de agua de bebida (BSO-10). El prazosin se dio a través de agua de bebida a una concentración de 10 mg/100 ml. Esta dosis se utilizó previamente en un protocolo similar en ratas. Todos los tratamientos se iniciaron al mismo



tiempo y se mantuvieron durante 5 semanas. El protocolo experimental fue el mismo que para el Experimento I.

### **3.3. Experimento III: Evaluación de la contribución del sistema nervioso simpático sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca en la hipertensión inducida por estrés oxidativo.**

Se analizó la respuesta de la PS y FC a la inyección intravenosa de un bloqueante simpático.

Se utilizaron ratones de la cepa CBA-C57 de peso inicial de 20-25gr repartidos en los 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 administrándole BSO a 10mM a través de agua potable (BSO-10). El bloqueador de la actividad simpática administrado fue pentolinium (Sigma) a dosis de 10mg/Kg en un grupo control y ratones tratados con BSO. Tras cinco semanas de tratamiento con BSO se cateterizó la arteria carótida y la vena yugular como se ha descrito en el apartado 2.3, dándole al animal un período de recuperación de 24-h antes de realizar el experimento. Esta dosis de pentolinium se ha utilizado

anteriormente en nuestro laboratorio para demostrar las diferencias en el tono simpático (Wangensteen et al., 2006).

#### **3.4. Experimento V: Efecto de la inducción del hipertiroidismo en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.**

Se analizó la respuesta de la inducción de hipertiroidismo en ratones de la cepa CBA C57 junto al desarrollo de hipertensión inducida por aumento del estrés oxidativo con BSO.

Todos los animales tuvieron libre acceso a la comida y bebida, administrando en el agua de la bebida correspondiente según los grupos descritos en el apartado 2.1, BSO a dosis de 10mM. El hipertiroidismo en ratones se produjo mediante la inyección de T4 subcutánea a dosis de 5µg/ratón/día y a la vez, en estos animales se ha generado el modelo de hipertensión con BSO. Los tratamientos se iniciaron al mismo tiempo y se mantuvieron durante 4 semanas. Semanalmente, se medía el peso del animal, la FC y la PAS por medio de pletismografía como se ha descrito en el apartado 2.2. En la cuarta semana, se introdujeron a los animales en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España) con libre acceso a comida y bebida,

y sus tratamientos durante 4 días (dos días de adaptación y otros dos de experimentación) al igual modo que en el experimento I.

Tras el fin del estudio metabólico, se obtuvieron las muestras sanguíneas, tejidos y matanza del animal de igual modo al usado en el experimento I.

### **3.5. Experimento V: Efecto de la inhibición de la SOD en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.**

Se evaluó el efecto de la inhibición de la SOD en ratones con el modelo de hipertensión inducida por estrés oxidativo y sus efectos en la PA, función endotelial y variables morfológicas y plasmáticas en ratones cepa CBA C57.

Todos los animales tuvieron libre acceso a la comida y bebida, administrando en el agua de la bebida correspondiente según los grupos descritos en el apartado 2.1, BSO a dosis de 10mM y/o DETC a dosis de 10mmol/L. Los tratamientos se iniciaron al mismo tiempo y se mantuvieron durante 5 semanas. Semanalmente, se medía la PAS por medio de pletismografía como se ha descrito en el apartado 2.2. En la quinta semana, se introdujeron a los animales en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España) con libre acceso a comida y bebida, y sus tratamientos durante 4

días (dos días de adaptación y otros dos de experimentación) al igual modo que en el experimento I.

Tras el fin del estudio metabólico, se canalizó la arteria carótida y vena yugular, realizando registro directo de PA y FC al igual que en el experimento I. Tras el registro directo se obtuvieron las muestras sanguíneas, tejidos y se realizó la matanza del animal como se expone en el experimento I.

#### **4. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

##### **4.1. Determinación de proteínas, electrolitos, urea, creatinina.**

Se midió la proteinuria mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la medición de los electrolitos en plasma y en orina, y de creatinina se utilizó un autoanalizador (Beckman CX4, EE.UU).

##### **4.2. Determinación de hormonas tiroideas.**

Los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas se determinaron usando un kit de radioinmunoensayo según las instrucciones del fabricante (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). La TSH

plasmática se determinó mediante enzimoimmunoanálisis con quimioluminiscencia usando el autoanalizador Immunolite 2000 (Euro/dpc, Llanberis, Gwynedd, UK).

#### **4.3. Determinación de isoprostanos F-2.**

Para la determinación total de isoprostanos F2, 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 analizarlo. Los isoprostanos F2 totales se midieron por enzimoimmunoensayo competitivo (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), para medir los niveles urinarios, con muestras previamente purificadas.

#### **4.4. Determinación hepática de GSH.**

Las muestras hepáticas fueron rápidamente recogidas, limpiadas y congelados en nitrógeno líquido, guardándose posteriormente a -80°C para la medición del contenido total de glutatión. El contenido de GSH total del tejido hepático se determinó por medio del kit comercial de GSH Caimán (Cayman Chemical Co).

#### **4.5. Determinación de niveles plasmáticos de noradrenalina.**

Para la medida de niveles plasmáticos de noradrenalina se usaron kits de ELISA (ELISA, IBL internacional, Hamburgo, Alemania).

#### **5. Estudio histopatológico.**

Para la morfología convencional, se tiñeron secciones longitudinales del riñón de ratón en el plano sagital incrustadas en parafina y formaldehído tamponado al 4%, con hematoxilina, eosina y ácido periódico de Schiff (PAS). Se evaluó la extensión de la lesión vascular (estenosis, arteriopatía hialina e hiperplasia mioíntimal) mediante el examen de los perfiles de las arterias y arteriolas en una sola sección del riñón y contando los vasos afectados. La presencia de lesiones glomerulares (glomeruloesclerosis y fibrosis capsular) se evaluó en al menos 200 glomérulos. También se evaluó la atrofia tubular, necrosis y cilindros tubulares. El estudio morfológico se realizó en las secciones de tejido de 4  $\mu\text{m}$  con microscopía de luz, utilizando la tinción más adecuada para cada lesión.

•**Estudio morfométrico.**

Las muestras fijadas en formalina tamponada al 4% e incrustadas en parafina se seccionaron en cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Posteriormente, se tiñeron con rojo Sirio al 1% F3BA (Gurr, BDH Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido) para la cuantificación del análisis de imagen. Para mejorar la tinción, los cortes de tejido se mantuvieron después de la desparafinación durante 3-5 días en alcohol al 70%, utilizado como fijador. El rojo Sirio tiñe las fibras conectivas de color rojo oscuro y los núcleos celulares y las estructuras citoplasmáticas se distinguen en rojo / amarillo brillante. El tejido conectivo intersticial y la morfometría glomerular se cuantificaron automáticamente en cortes histológicos de riñón de ratón utilizando varios algoritmos de procesamiento de imagen desarrollado en una aplicación de análisis de imágenes individuales, Fibrosis HR © (Masseroli et al.,1998).

**7. Análisis estadísticos.**

La evolución de la PS y la FC se comparó mediante un diseño anidado, con grupos y días como factores fijos y el ratón como factor aleatorio. Se utilizó el método de Bonferroni cuando la diferencia fue significativa. Las comparaciones de cada variable al final de los experimentos se realizaron

mediante la realización de un análisis de varianza unidireccional. Cuando la prueba de ANOVA fue significativa, se llevaron a cabo las comparaciones por pares utilizando el método de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con una  $P < 0,05$ .

Los datos cuantitativos se analizaron mediante el test-t de Student no pareado (cuando las varianzas fueron las mismas). Los resultados se expresan como  $EEM. \pm Media$ .





*"El tiempo es la mejor medicina."*

*Ovidio*



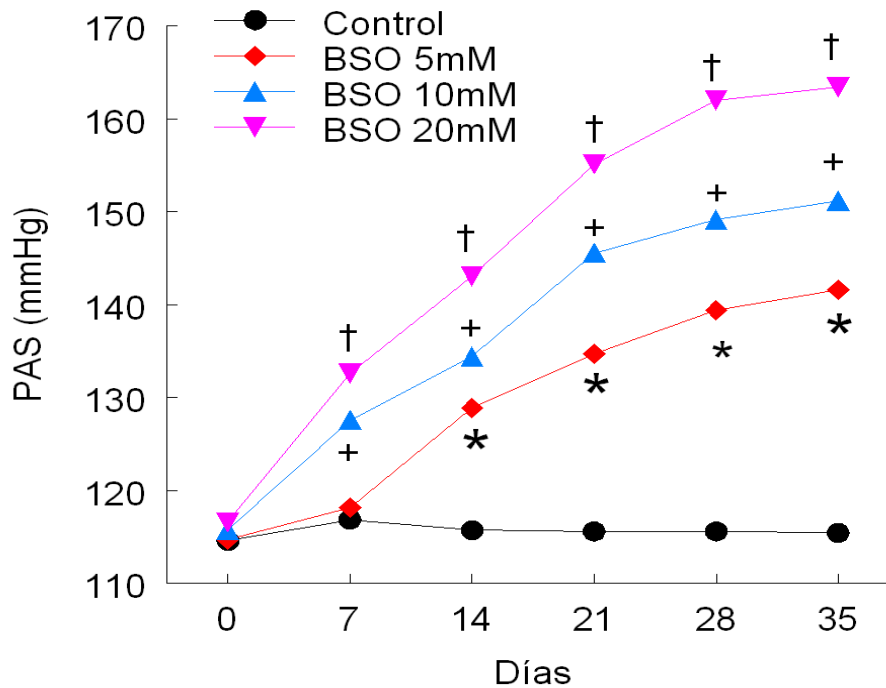
**IV. RESULTADOS**



## 1. Experimento I: Efectos de la administración crónica de dosis crecientes de BSO a los ratones normotensos.

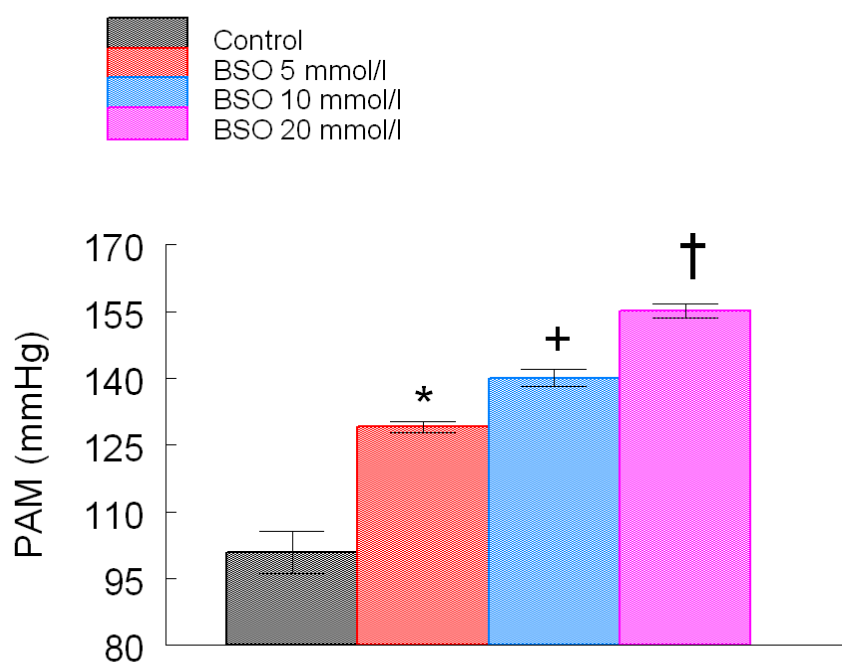
### 1.1.- Presión arterial sistólica.

La figura 3 y 4 muestran la evolución de la presión arterial sistólica (PAS) en el grupo control y los grupos tratados con BSO.



**Figura 3.** Presión arterial sistólica (PAS), medido por pletismografía en el grupo control y en los ratones tratados con dosis crecientes de BSO a 5 (BSO-5), 10 (BSO-10), o 20 (BSO-20) mM a través de agua de bebida. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar \* $P < 0,01$ , + $P < 0,01$  vs. BSO-5, † $P < 0,01$  vs. BSO-10 en comparación con los controles ( $n = 8$ , cada grupo).

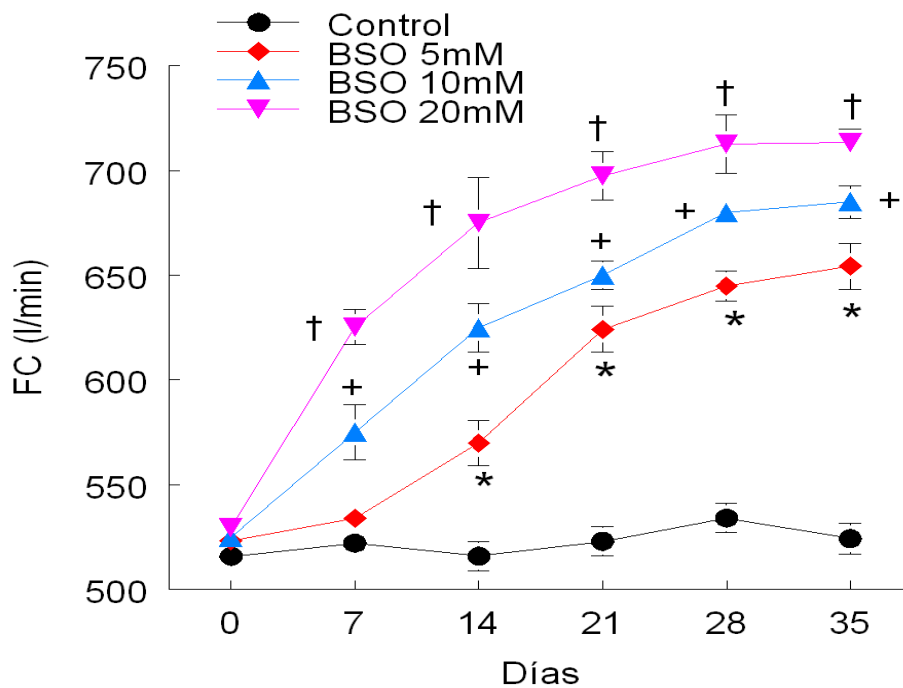
La administración de BSO produjo un aumento significativo dosis-dependiente de la PAS en comparación con el grupo control, como se muestra en la figura 3. La presión arterial media (PAM) final se valoró por registro directo confirmándose los datos obtenidos por pletismografía (figura 4). La presión de pulso también fue mayor en los grupos de ratones tratados con BSO.



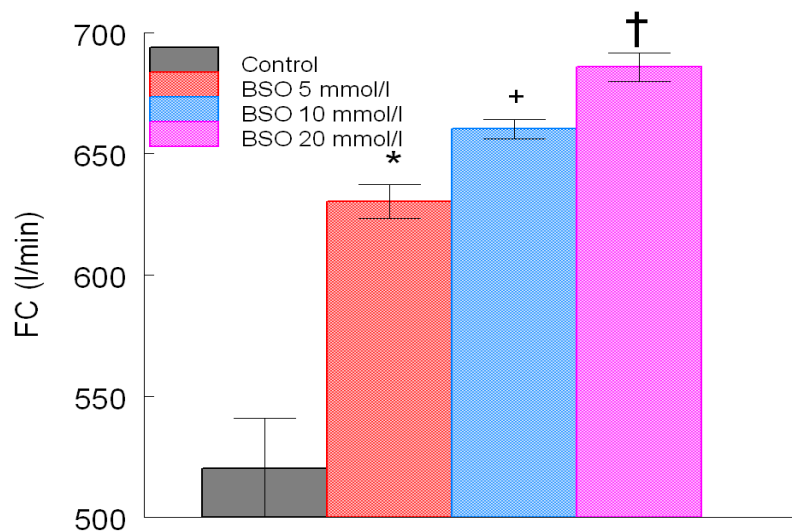
**Figura 4.** PAM final medida por registro directo (arteria carótida) en ratones en grupo BSO-10 y control. . Los datos son medias  $\pm$  e.e.m. \* $P < 0,01$ , + $P < 0,01$  vs. BSO-5, † $P < 0,01$  vs. BSO-10 en comparación con los controles ( $n = 8$ , cada grupo).

## 1.2.- Frecuencia cardiaca.

Los valores de la frecuencia cardiaca se resumen en la Figura 5 y 6. La figura 5 muestra la evolución de la frecuencia cardiaca (FC) y la figura 6 muestra la FC final medida mediante monitorización directa en los diferentes grupos experimentales.



**Figura 5.** Frecuencia cardiaca (FC), medido por pletismografía en el grupo control y en los ratones tratados con dosis crecientes de BSO a 5 (BSO-5), 10 (BSO-10), o 20 (BSO-20) mM a través de agua de bebida. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar \* $P < 0,01$ , + $P < 0,01$  vs. BSO-5, † $P < 0,01$  vs. BSO-10 en comparación con los controles ( $n = 8$ , cada grupo).



**Figura 6.** FC final medida por registro directo (arteria carótida) en ratones en grupo BSO-10 y control. . Los datos son medias  $\pm$  e.e.m. \*  $P < 0,01$  vs controles, +  $P < 0,01$  vs BSO-5, †  $P < 0,01$  vs. BSO-10 ( $n = 8$ , cada grupo).

La administración de BSO produjo un aumento significativo dosis-dependiente de la FC en comparación con el grupo control, como se muestra en la figura 5. La FC final se valoró por registro directo confirmándose un aumento estadísticamente significativo de esta (figura 6).

### 1.3. Variables morfológicas.

La tabla 1, muestra el peso corporal final (PCF), la ganancia de peso corporal ( $\Delta PC$ ), la ratio peso del riñón versus peso corporal (PR/PC), la ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso corporal (PVI/PC), la ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso del corazón (PVI/Pc), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	PCF (g)	$\Delta PC(g)$	PR/PC(mg/g)	PVI/PC(mg/g)	PVI/Pc
Control	25.83 $\pm$ 0.60	3.50 $\pm$ 0.53	7.28 $\pm$ 0.21	3.23 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.02
BSO-5 mM	25.29 $\pm$ 0.42	1.00 $\pm$ 0.23*	6.99 $\pm$ 0.23	3.17 $\pm$ 0.07	0.76 $\pm$ 0.02
BSO-10mM	23.0 $\pm$ 0.93	-0.83 $\pm$ 1.84*	7.32 $\pm$ 0.38	3.07 $\pm$ 0.13	0.76 $\pm$ 0.01
BSO-20mM	20.43 $\pm$ 0.57	0.50 $\pm$ 0.81*	7.38 $\pm$ 0.62	3.09 $\pm$ 0.12	0.74 $\pm$ 0.01

**Tabla 1:** Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M. PCF, peso corporal final;  $\Delta PC$ , ganancia en el peso corporal; PR/PC, relación entre el peso del riñón con el peso corporal; PVI/PC, relación peso del ventrículo izquierdo en relación con el peso corporal; PVI/Pc, relación peso del ventrículo izquierdo en relación con el peso del corazón. \*  $p < 0,05$ , versus grupo control.

Todos los grupos tratados con BSO mostraron una reducción leve pero significativa en la ganancia de peso en comparación con los controles (Tabla 1), siendo esta dosis dependiente.



El peso de los riñones y del ventrículo izquierdo en relación al peso corporal no muestra cambios significativos en ningún grupo en relación al grupo control. El peso del ventrículo izquierdo en relación al peso total del corazón no se modificó significativamente con ningún tratamiento.

#### 1.4. Variables metabólicas

La tabla 2 muestra los valores medios de ingesta de agua y comida por cada 30 g de peso del animal durante 24 horas, medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	Ingesta de comida g/30g/24h	Ingesta de bebida ml/30g/24h
<b>Control</b>	3.54±0.38	4.87±0.42
<b>BSO-5mM</b>	3.40±0.33	4.92±0.29
<b>BSO-10mM</b>	3.55±0.34	4.65±0.13
<b>BSO-20Mm</b>	3.86±0.47	6.07±0.61

*Tabla 2. Los datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control.*

El estudio de las variables metabólicas en el final del tratamiento muestra datos similares en la ingesta de bebida y comida (g/30 g de peso

corporal) en todos los grupos (Tabla 2), sin encontrar ninguna diferencia significativa.

### 1.5.-Variables plasmáticas.

Se han medido los valores plasmáticos medios de sodio, potasio y creatinina al final del periodo experimental en los diferentes grupos, sin encontrar diferencias significativas en los niveles de sodio, urea, potasio, proteínas totales, o creatinina entre los grupos en el experimento I.

### 1.6.-Variables urinarias.

Se midieron al final del experimento los balances de agua y sodio expresados por cada 30 g de peso del animal durante 24 horas, tasa de excreción de proteínas en  $\mu\text{g}/100\text{g}$  en 24h, expuestos en la tabla 3.

Grupos	Balance de agua ml/30g/24h	Balance de sodio mmol/30g/24h	Proteinuria $\mu\text{g}/100\text{g}/24\text{h}$
Control	5.83±0.37	0.18±0.08	26.52±2.6
BSO-5mM	4.54±0.24	0.23±0.09	23.03±4.71
BSO-10mM	4.92±0.27	0.22±0.003	19.56±2.67
BSO-20Mm	5.24±0.22	0.24±0.07	19.21±4.09

*Tabla 3. Los datos expresados como media + EEM. \*  $P < 0,01$  en comparación con el grupo control*

El balance de agua y sodio, así como la tasa de excreción de proteínas no se modificó de modo significativo en ningún grupo tratado con BSO.

### 1.7.-Hormonas tiroideas.

Los valores plasmáticos de T4 libre y T3 libre fueron similares en el grupo control y en el grupo BSO-10. Los valores de las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas se exponen en la tabla 4.

Grupos	FT4 (ng/dl)	FT3 (pg/dl)
Control	1.76±0.14	4.14±0.22
BSO-10mM	2.00±0.34	4.64±0.36

*Tabla 4. Los datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control*

### 1.8.- Contenido de Glutación hepático en el grupo tratado con BSO-10

Los animales tratados con BSO mostraron una disminución dosis-dependiente en el contenido total de GSH del tejido hepático. Los valores de las concentraciones hepáticas encontrados son los mostrados en la tabla 5.

Grupos	Glutation hepático ( $\mu\text{mol/l/tej.h}$ )
Control	5 $\pm$ 0.2
BSO-5mM	3.1 $\pm$ 0.3*
BSO-10mM	2.3 $\pm$ 0.2*
BSO-20mM	1.27 $\pm$ 0.1**

**Tabla 5.** Los datos expresados como media + EEM. \*  $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  en comparación con el grupo control

El contenido de GSH total hepático se correlaciona inversamente con los valores al final del experimento medidos por pletismografía de PAS media ( $r = -0,80$ ,  $P \leq 0,001$ ) y con la FC ( $r = -0.80$ ,  $P < 0,001$ ).

### 1.9.- Noradrenalina plasmática.

Se midió la concentración plasmática de noradrenalina en el grupo control y en los grupos tratados con BSO. Los datos obtenidos se representan en la tabla 6.

Grupos	NA plasmática ng/ml
Control	0.9 $\pm$ 0.21
BSO-5mM	1.8 $\pm$ 0.27*
BSO-10mM	2.5 $\pm$ 0.30*
BSO-20Mm	3.5 $\pm$ 0.35*

**Tabla 6.** -Los datos expresados como media + EEM. \*  $P < 0,01$  en comparación con el grupo control

La administración de BSO en ratones produce un aumento de la concentración plasmática de noradrenalina dosis dependiente, siendo este aumento en todos los grupos estadísticamente significativo (Tabla 6).

### 1.10. -Excrección urinaria de Isoprostanos F2 $\alpha$

Se cuantificó la excreción urinaria de Isoprostano F2 $\alpha$ , como variable para cuantificar el estrés oxidativo en este modelo de hipertensión. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7. La excreción total de isoprostanos se incrementó de modo significativo en el grupo BSO-10.

Grupos	Isoprostrano-F2 $\alpha$ $\mu\text{g}/30\text{g}/24\text{h}$
Control	1.72 $\pm$ 0.27
BSO 10Mm	4.96 $\pm$ 0.12*

*Tabla .7. -Datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control*

### 1.11. Niveles de Isoprostanos F2 $\alpha$ en tronco de encéfalo

Los niveles isoprostanos en tronco de encéfalo fueron más altos en el grupo tratado con BSO-10 que en el grupo control. Los datos se muestran en la tabla 8.

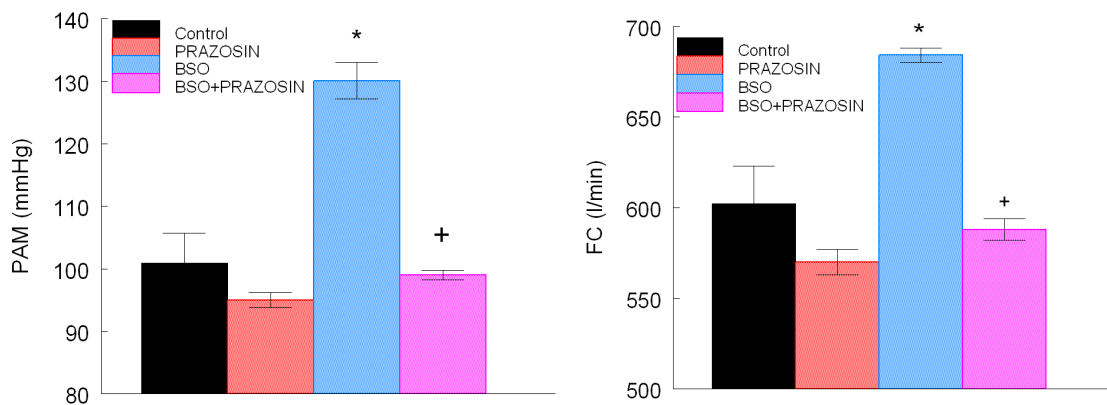
Grupos	Isoprostanos (pg/mg-tejido)
Control	0,13 $\pm$ 0.02
BSO-10	0,25 $\pm$ 0.05*

*Tabla .8. -Los datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control*

## 2. Experimento II: Efectos del bloqueo alfa adrenérgico de modo crónico sobre la presión arterial, función renal y otras variables de la hipertensión arterial inducida por estrés oxidativo.

### 2.1.- Presión arterial sistólica y frecuencia cardíaca.

Las figuras 7 y 8 resumen los valores de PAM y FC después del bloqueo crónico  $\alpha$ 1-adrenérgico con prazosin. La administración de prazosin a ratones tratados con BSO-10 redujo la PAM final, la FC, y la presión de pulso, obteniéndose valores similares entre el grupo BSO 10 + prazosin y los controles. La administración de prazosin a los controles redujo ligeramente estas variables, pero sin llegar a tener significación estadística.



**Figura 7 y 8.** PAM final y FC final medida por registro directo (arteria carótida) en ratones despiertos en grupo BSO-10+ prazosin, prazosin, BSO-10 control. . Los datos son medias  $\pm$  e.e.m. \*  $P < 0,01$  vs controles, +  $P < 0,01$  vs BSO-10-ratones tratados ( $n = 8$ , cada grupo).

En la tabla 9, se presentan los valores obtenidos de presión de pulso mediante registro directo, obteniendo diferencias significativas en el grupo BSO-10, pero sin observar diferencias en los grupos tratados con prazosin en referencia al grupo control y sí observando una disminución significativa en la presión de pulso en el grupo BSO10+Prazosin frente al grupo BSO-10.

Grupos	Presión de pulso
Control	27.6±1.6
BSO-10mM	37.6±1.7*
Prazosín	24.0±1.3
BSO-10mM + Prazosín	26.5±1.0+

**Tabla 9.** Valores de la presión de pulso mediante registro directo. Los datos expresados como media + EEM. \*  $p < 0,01$  frente a los controles; +  $p < 0,01$  frente al grupo BSO-10.

## 2.2. Variables morfológicas.

La tabla 10 muestra el peso corporal final (PCF), la ganancia de peso corporal ( $\Delta PC$ ), la ratio peso del riñón versus peso corporal (PR/PC), la ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso corporal (PVI/PC) y la ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso del corazón (PVI/Pc), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.



Grupos	PCF (g)	$\Delta$ PC(g)	PR/PC (mg/g)	PVI/PC (mg/g)	PVI/Pc
Control	29.71±1.52	2.25±0.43	6.09±0.41	3.00±0.10	0.77±0.01
Prazosin	24.86±0.74	3.00±0.52	5.74±0.07	2.87±0.14	0.74±0.01
BSO-10mM	25.83±0.50	-0.65±0.34*	6.03±0.12	2.77±0.08	0.72±0.01
BSO-10mM + Prazosin	28.00±1.00	-0.38±0.81*	6.45±0.33	2.72±0.07	0.72±0.02

**Tabla 10.** Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M. PCF, peso corporal final;  $\Delta$ PC, ganancia en el peso corporal; PR/PC, relación entre el peso del riñón con el peso corporal; PVI/PC, relación peso del ventrículo izquierdo en relación con el peso corporal; PVI/Pc, relación peso del ventrículo izquierdo en relación con el peso del corazón. \*  $p < 0,05$ , versus grupo control.

El tratamiento con prazosín no modificó significativamente la ganancia de peso en comparación con el grupo control o con el grupo BSO-10mM. El peso renal en relación con el peso corporal, la relación del peso del ventrículo izquierdo con el peso corporal ni la relación del ventrículo izquierdo con el peso cardiaco se afectó con el tratamiento con prazosin en comparación con el grupo control o con el grupo BSO-10mM. Lo que sí se vio afectado de modo significativo es la ganancia de peso en el grupo Prazosin+BSO-10mM, observándose una disminución significativa de la ganancia de peso en este grupo y en el grupo BSO-10mM.

### 2.3. Variables metabólicas.

La tabla 11 muestra los valores medios de ingesta de agua y comida por cada 30 g de peso del animal durante 24 horas, medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Grupos	Ingesta Comida (gr/30gr/24h)	Ingesta de Bebida (gr/30gr/24h)
Control	3.32±0.57	5.15±0.56
Prazosin	4.08±0.59	5.97±0.56
BSO 10mm	3.24±0.44	6.23±0.43
BSO 10mM +Prazosin	3.13±1.18	6.33±1.73

*Tabla 11. Los datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control.*

Los estudios metabólicos en el final del tratamiento mostraron similares en la ingesta de comida y de agua de bebida (g/30 g de peso corporal) en todos los grupos sin encontrar diferencias significativas.

## 2.4. Variables plasmáticas.

Se han medido los valores plasmáticos medios de sodio, potasio y creatinina al final del periodo experimental en los diferentes grupos, sin encontrar diferencias significativas. al igual que en el experimento I (tabla 12).

Grupos	Control	BSO 10Mm	Prazosin	BSO 10mM +Prazosin
Urea(mg/dl)	34.87±1.77	45.35±3.35	41.10±4.16	37.98±2.09
Crea(mg/dl)	0.68±0.11	0.46±0.09	0.78±0.02	0.72±0.03
P.T.(g/dl)	3.79±0.23	3.33±0.10	4.37±0.19	4.13±0.14
Ca(mmol/l)	1,68±0.07	1.72±0.07	2.00±0.03	1.83±0.04
Na(mmol/l)	162.00±6.59	172.50±3.53	163.50±0.01	162.86±2.96
K(mmol/l)	5.07±0.61	3.79±0.22	4.29±0.59	3.80±0.11
Cl(mmol/l)	102.21±1.65	111.50±2.41	112.00±1.00	106.71±2.08

**Tabla 12.** Valores plasmático de urea, creatinina, proteínas totales (P.T), Calcio (Ca), Sodio (Na), Potasio (K) y Cloro (Cl) en los grupos del experimento II.

## 2.5.-Variables urinarias.

Se midieron al final del experimento los balances de agua y sodio expresados por cada 30 g de peso del animal durante 24 horas, tasa de excreción de proteínas en  $\mu\text{g}/100\text{g}$  en 24h, expuestos en la tabla 13 y 14.

Grupos	Balance de agua ml/30g/24h	Balance de Na mmol/30g/24h
Control	5.45±0.47	0.17±0.02
BSO 10mM	5.82±0.40	0.21±0.03
Prazosin	5.64±0.51	0.19±0.02
BSO 10mM +Prazosin	5.77±1.45	0.23±0.06

*Tabla 13. Balance de agua y sodio. Los datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control*

Grupos	Aclaramiento de creatinina ( $\mu\text{l}/\text{min}/30\text{g}$ )	ET proteínas ( $\mu\text{g}/100\text{g}/24\text{h}$ )
Control	24.0±1.04	27.71±3.10
BSO 10mM	19.1±1.9	24.16±1.28
Prazosin	23.4±2.4	21.28±1.07
BSO 10mM + Prazosin	21.2±6.2	20.88±6.18

*Tabla 14. -Estudio de proteinuria. Los datos expresados como media + EEM. \* P <0,01 en comparación con el grupo control.*

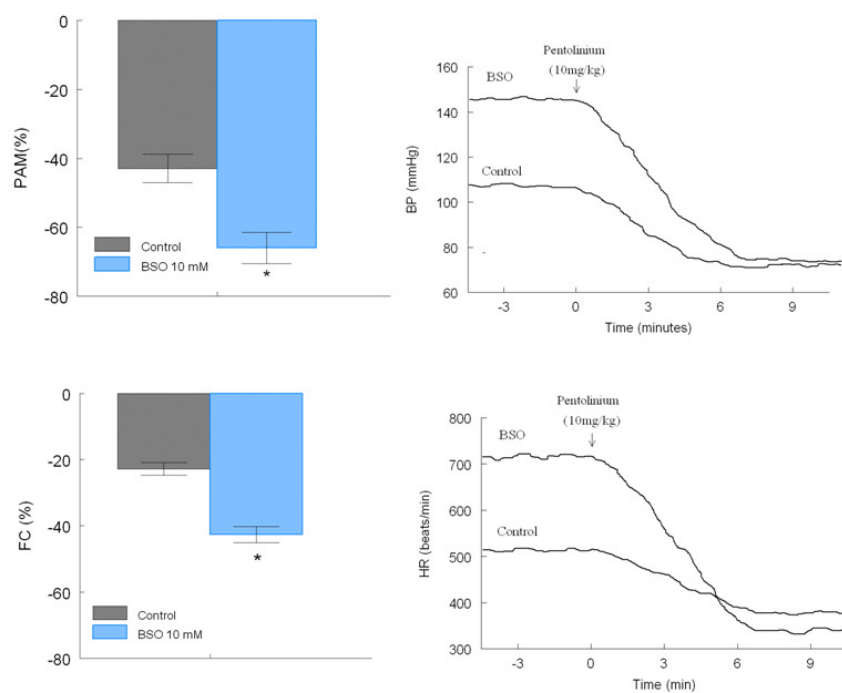
El balance de agua y sodio, así como la tasa de excreción de proteínas no se modificó de modo significativo en ningún grupo tratado con prazosín comparándolos con el grupo control ni comparándolos con el grupo BSO-10mM.

### **3. Experimento III: Evaluación de la contribución del sistema nervioso simpático sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca en la hipertensión inducida por estrés oxidativo**

#### **3.1. Respuesta hemodinámica al bloqueo ganglionar**

Para valorar la respuesta de PAM y FC de los ratones tratados con BSO-10mM ante el bloqueo ganglionar simpático, se inyectó intravenosamente pentolinium a dosis de 10 mg/Kg de ratón, a la vez que se realizaba un registro de presión arterial y frecuencia cardiaca directa.

En la Figura 9 se resumen los datos sobre el componente simpático de la presión arterial en el grupo control y en los ratones tratados con BSO-10mM. El bloqueo ganglionar agudo con pentolinium produjo una mayor disminución en la PAM y FC en los ratones tratados con BSO frente a los controles.

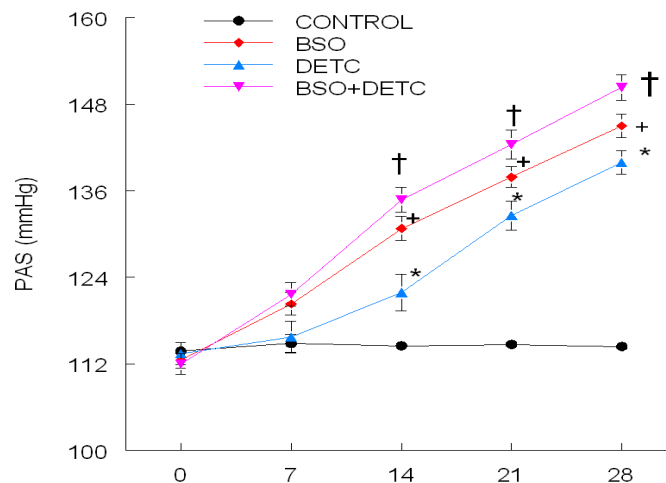


**Figura 9.** - Respuesta de la PAM y FC ante el bloqueo agudo del sistema nervioso simpático de modo agudo. Disminución porcentual inducida por la administración aguda de pentolinium (10mg/Kg) en la PAM y FC en ratones conscientes en grupo control y BSO-10Mm. Los datos son medias  $\pm$  EEM. \*  $P < 0,01$  en comparación con controles ( $n = 8$ , cada grupo).

#### 4. Experimento IV: Efecto de la inhibición de la SOD con DETC en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.

##### 4.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca.

La administración de BSO provoca, en ratones normotensos, aumento en las cifras de PAM a lo largo de las semanas de tratamiento, si se administra a ratones normotensos DETC, también se observa un aumento en las cifras de PAM no tan acusado como el que provoca el tratamiento con BSO, y si se administra conjuntamente BSO+DETC, el incremento de PAM es mayor de modo significativo. La administración de DETC produce aumento dosis dependiente en la PAM. Sin embargo la tasa de FC no se modificó significativamente en relación al grupo control.



**Figura 10.-:** Evolución de la PAS en los diferentes grupos de tratamiento. Los datos son medias  $\pm$  EEM. \*  $P < 0,01$  en comparación con grupo control \*  $P < 0,01$  en comparación con grupo DETC y †  $P < 0,01$  en comparación con grupo BSO+DETC en comparación con grupo control. ( $n = 8$ , cada grupo).



## 4.2. Variables morfológicas.

No se han encontrado diferencias significativas en el peso corporal semanal o el peso al final del experimento. Los datos absolutos y relativos en cuanto al peso del ventrículo izquierdo, ventrículo derecho o el peso cardiaco no se afectaron de modo significativo con el tratamiento con DETC. El peso renal ni el hepático tampoco fue significativamente mayor con el tratamiento con DETC (tabla 15).

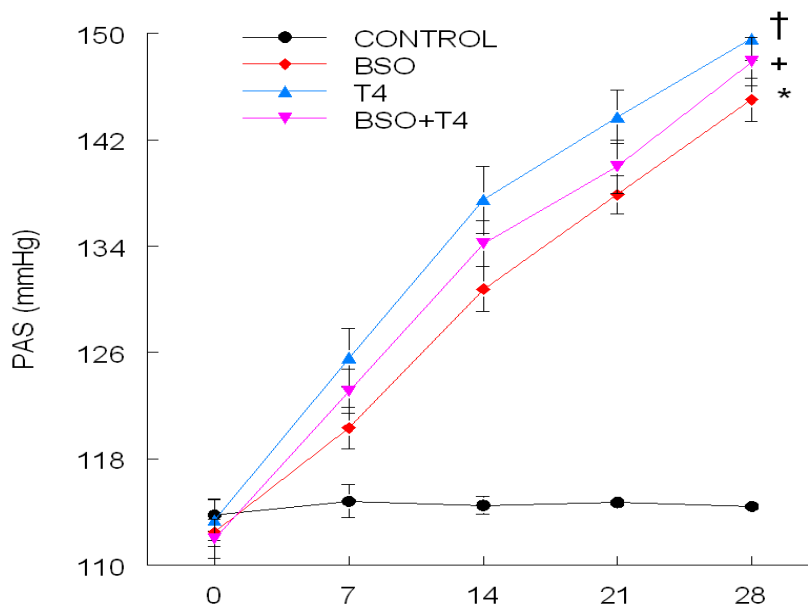
Grupos	Control	BSO 10mM	DETC	DETC+T4
PC(gr)	20.88±0.5	24.60±0.67	25.50±0.99	27.83±0.83
PR (mg)	142.46±4.1	191,32±18.2	173.43±3.35	169.07±2.75
Pc(mg)	97.87±2.6	125.16±7.81	124.01±3.34	117.88±0.89
PVI(mg)	61.26±3.97	89.58±6.44	96.12±1.25	91.49±1.82
PVD(mg)	36.61±4.75	35.58±2.18	27.79±2.62	26.38±1.16
PH(g)		1.437±0.095	1.198±0.047	1.123±0.002

**Tabla 15:** Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M, PC, peso corporal; PR: peso renal Pc: peso del corazón; PVI: peso del ventrículo izquierdo PVD: peso del ventrículo derecho.  
\*  $p < 0,05$ , versus grupo control, + $p < 0.05$  vs grupo T4

## 5. Experimento V: Evaluación del efecto de la inducción del hipertiroidismo en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.

### 5.1. Variables hemodinámicas

La PA de los ratones en tratamiento con tiroxina T4, aumenta de modo progresivo y significativo a lo largo de las 4 semanas de tratamiento. Este aumento de PAM también se observa en el grupo BSO+T4, pero alcanza una cifra máxima al final del tratamiento menor que en el grupo T4 y mayor que en el grupo BSO (figura 11).



**Figura 11.** - PAS medida por pletismografía en los ratones tratados con BSO-10 y/o Tiroxina. Los datos son medias  $\pm$  EEM. \*  $P < 0,01$  en comparación con controles ( $n = 8$ , cada grupo).

## 5.2. Variables morfológicas

En las variables analizadas, hemos encontrado que el tratamiento con BSO+T4 en ratones, disminuye el aumento de peso del VI que se produce en el estado hipertiroideo como puede observarse en la tabla 16. También observamos que la reducción de peso del animal que se produce durante el tratamiento con T4, no se observa en el grupo BSO+T4.

Grupos	CONTROL	BSO 10 mM	T4	BSO+T4
PC(g)	20.88±0.59	24.60±0.67	16.73±0.14*	27,63±1.08+
PR(mg)	142.46±4.18	191,32±18.2	187.11±8.92	179.66±6.15
Pc(mg)	97.87±2.62	125.16±7.81	139.22±7.21	123.28±6.04
PVI(mg)	61.26±3.97	89.58±6.44	106.69±5.73*	88.86±4.79+
PVD(mg)	36.61±4.75	35.58±2.18	32.53±1.85	34.42±2.99

**Tabla 16.** - Los datos se expresan como media ± E.E.M, PC, peso corporal; PR: peso renal Pc: peso del corazón; PVI: peso del ventrículo izquierdo PVD: peso del ventrículo derecho.  
\* p <0,05, versus grupo control, +p <0.05 vs grupo T4

De estos datos podemos extraer que el tratamiento con BSO en ratones hipertiroideos previene la disminución del peso corporal, así como la hipertrofia cardiaca y renal.

*"La medicina puede ser considerada  
como el conocimiento de las preferencias y los deseos  
del cuerpo y la manera de satisfacerlos o no."  
Platón*



CONCLUSIÓN



## 1. Efectos de la administración crónica de dosis crecientes de BSO a los ratones normotensos.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de hipertensión por déficit de GSH en ratones. Hemos encontrado que la administración de BSO en ratones produce una elevación dosis-dependiente de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca. Este modelo experimental tiene la ventaja de evaluar los efectos del estrés oxidativo como un estímulo primario de la hipertensión. Una contribución importante de este trabajo es el hallazgo de que la hipertensión no es probablemente una causa, sino una consecuencia del aumento del estrés oxidativo. Este descubrimiento es concordante con los descubrimientos previos en ratas (Jonhs et al., 1996).

Decidimos adaptar el modelo de hipertensión inducida por BSO a los ratones, a pesar de las dificultades técnicas de manejo de los diminutos órganos y vasos sanguíneos, debido a que el uso de ratones en lugar de las ratas reduce el coste de los experimentos y permite un estudio a largo plazo, especialmente teniendo en cuenta el alto precio del BSO. También permite una mejor comparación con ratones transgénicos.

Nuestros resultados demuestran que la administración de BSO produce un aumento dosis-dependiente en la *frecuencia cardíaca*. Muy pocos estudios valoran esta variable en este modelo de hipertensión en ratas, y como los expuestos previamente por Ford et al. (2006), en los que la

frecuencia cardiaca no se afecta significativamente por el tratamiento a través de varias medidas en diferentes días de muestreo, o los llevados a cabo por Ganafa et al.(2002), en los que si encontraron modificaciones en la FC tras administración de BSO durante 24h.

El aumento simultaneo de la PA y FC en los ratones tratados con BSO se asemeja a las manifestaciones hemodinámicas de un estado hipertiroideo (Vargas et al., 2006), por lo que medimos los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas. Estas fueron similares entre los controles y los ratones tratados con BSO, descartando la posible contribución de una mayor función tiroidea en la hipertensión inducida por estrés oxidativo.

En cuanto al contenido de *glutación hepática* lo encontramos disminuidos en los ratones tratados con BSO, en consonancia con los estudios en ratas, lo que indica (Vaziri et al., 2000; Ganafa et al., 2002; Zhou et al., 2002) la eficacia del procedimiento. Así mismo, los *niveles de isoprostanos* los encontramos elevados y también estaba aumentada la excreción urinaria de estos, siendo considerado un índice sensible y fiable de estrés oxidativo in vivo (Roberts et al., 2000), en concordancia con observaciones previas (Bayorh et al., 2003; Banday et al., 2007). Nuestros resultados verifican el aumento del estrés oxidativo en los ratones tratados con BSO.

Los valores de la *concentración de creatinina sérica, el aclaramiento de creatinina, y los valores de la excreción de proteínas urinarias* fueron similares entre los grupos tratados con BSO y controles. El estudio con microscopia no encontró anomalías morfológicas en los riñones de los ratones tratados con BSO al igual que lo encontrado hasta ahora en ratas según diferentes autores (Vaziri et al., 2000; Banday et al., 2007; Zhou et al., 2002), lo que sugiere que el estrés oxidativo per sé no puede inducir enfermedad renal y/o alteraciones morfológicas en el riñón por lo menos en el periodo analizado en este estudio.

*El peso relativo del ventrículo izquierdo (VI)* se mantuvo sin cambios en los ratones tratados con BSO, a pesar de su hipertensión, al igual que lo demostrado por Ford et al. (2006) en ratas tratadas con BSO. Nuestros resultados son concordantes con los resultados de Johns et al., (1996) en los que inesperadamente observaron que en los ratones con hipertensión renovascular e hipertensión por DOCA no desarrollaron cardiomegalia tras 4 semanas de inducción de hipertensión. Los resultados anteriores sugieren una sensibilidad reducida a desarrollar cardiomegalia en ratones. Además, la ausencia de hipertrofia cardíaca y renal observada en los ratones tratados con BSO pueden estar relacionadas con una disminución de expresión de  $\alpha$ -tubulina en el tejido renal como en las proteínas del citoesqueleto, especialmente susceptibles al estrés oxidativo ya que la  $\alpha$ -tubulina es un



objetivo importante de carboxilación en el cerebro de rata después de la depleción de GSH, observado por Bizzozero et al. (2007).

**→Posibles mecanismos por los que el estrés oxidativo produce hipertensión.**

El mecanismo por el cual el BSO eleva la PA no está totalmente aclarado. Grossman (2008) propuso una serie de posibles mecanismos por los que el estrés oxidativo puede causar hipertensión, entre los que se encuentran:

- la disminución del óxido nítrico por las ROS, como el superóxido (McIntyre et al., 1999).

- la generación de productos vasoconstrictores provenientes de la peroxidación lipídica, como el Isoprostano F2 ( Cracowski et al., 2002).

- el agotamiento de cofactores de la NO sintasa, como la tetrahidrobiopterina (Vaziri et al., 2000).

- alteraciones estructurales y funcionales en la vasculatura (Zalba et al., 2001), que incluyen daño en las células endoteliales y en las musculares lisas, aumentos de las concentraciones celulares de calcio libre y estimulación de las señales proinflamatorias (Zalba et al., 2001; Chen et al., 2001; Schiffrin, et al., 2002).

Este estudio proporciona evidencia de que el aumento del tono simpático tiene un papel importante en el aumento de la PA y FC en el modelo de hipertensión arterial por BSO en ratones. Nuestros resultados indican que este modelo de hipertensión en ratones no se acompaña de hipertrofia cardíaca o alteraciones funcionales o morfológicas renales tras 5 semanas de tratamiento.

## 2. Papel del SNS en la Hipertensión arterial inducida por administración crónica de BSO.

En el modelo animal de hipertensión por BSO, que es el prototipo de hipertensión inducida por estrés oxidativo, se ha evaluado la contribución potencial de varios factores patógenicos, entre los que se encuentran anomalías en la reactividad vascular (Ganafa et al., 2002; Ford et al., 2006), la actividad del SRA ( Bayorh et al., 2003), la producción de PGH<sub>2</sub>-TXA<sub>2</sub> (Ganafa et al., 2002; Bayorh et al., 2003), la natriuresis inducida por dopamina (Banday et al., 2007) y los factores derivados del endotelio (Vaziri et al., 2000; Zhou et al., 2002). Sin embargo, hasta ahora, no se había evaluado la contribución del tono simpático en este modelo de hipertensión. El objetivo de este estudio era determinar la contribución del sistema nervioso simpático al aumento de la PA y FC en el modelo de hipertensión inducida por BSO en ratones.

Hemos encontrado que la hipertensión inducida por BSO está acompañada de un aumento de los niveles plasmáticos de noradrenalina. También hemos observado que el bloqueo crónico del sistema nervioso simpático con *prazosin*, un agonista del receptor  $\alpha_1$ -adrenergico, previene la elevación de la PAM y FC en los ratones tratados con BSO, y que el bloqueo ganglionar agudo con *pentolinium* produce una mayor disminución de PAM y

FC en los ratones tratados con BSO que en los controles. Por lo tanto, proponemos que el BSO aumenta el estrés oxidativo central y periférico, que puede producir una activación central o activación periférica del tono simpático provocando elevación de la PA y FC en los ratones tratados con BSO.

Varios estudios han demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la modulación central y periférica de la actividad simpática (Campese et al., 2004; Zanzinger et al., 2009; Xu et al., 2002; Shokoji et al., 2003; Shokoji et al., 2004; Chen et al., 2007) y que el estrés oxidativo aumenta el tono simpático en diversos tipos experimentales de hipertensión. (Zimmerman et al., 2002; Kishi et al., 2004; Xu et al., 2002). Además, el efecto hipotensor de algunos fármacos antihipertensivos se ha asociado a disminución del estrés oxidativo en el tronco de encéfalo (Kishi et al., 2003; Araki et al., 2009; Chan et al., 2009). Estas observaciones en conjunto, sugieren un importante papel de la activación del sistema nervioso simpático por aumento del estrés oxidativo en la hipertensión.

El mecanismo por el cual el BSO aumenta el tono simpático todavía no está completamente aclarado, pero una posible explicación es una inactivación del óxido nítrico inducida por el aumento del estrés oxidativo resultante de la reacción con el anión superóxido, sugiriendo que el NO modula negativamente la actividad de la norepinefrina en la

neurotransmisión simpática, y lo lleva a cabo por la desactivación de una porción de norepinefrina en la unión neuroefectora, colocando un freno en la actividad presináptica y postsináptica. Por otro lado, la pérdida de NO conduce a un aumento en la cantidad de norepinefrina dentro de la unión neuroefectora (Kolo et al., 2004). La hipertensión inducida por BSO se ha asociado con una reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico producido por ROS (Zhou et al., 2002).

Los efectos del estrés oxidativo como un estímulo primario que conduce a la hipertensión crónica y a la estimulación simpática es un campo que suscita gran interés. En los experimentos descritos en esta tesis se evalúa el papel del estrés oxidativo en la hipertensión arterial inducida por BSO en ratones. Este modelo experimental tiene la ventaja de evaluar los efectos del estrés oxidativo como un estímulo primario de hipertensión. Como se ha expuesto previamente, los datos nos indican que el tono simpático desempeña un papel importante en la hipertensión inducida por estrés oxidativo. Por tanto, a largo plazo, el aumento del estrés oxidativo cerebral, podría aumentar el tono vasomotor, y este tener un papel esencial en la hipertensión. En el presente estudio no tenemos mediciones directas de la actividad del sistema nervioso simpático, y por consiguiente, no es posible, determinar si el aumento de la actividad vasomotora simpática está topográficamente organizada o no en el modelo BSO, por lo que dilucidar los

mecanismos implicados en la estimulación simpática central inducida por estrés oxidativo puede ser un nuevo paradigma para el tratamiento de la hipertensión arterial. Sin embargo, son necesarios más estudios de integración y moleculares para una mejor comprensión de la relación entre el estrés oxidativo y la hipertensión arterial (Campos, 2010).

### 3. Efecto de la inhibición de la SOD con DETC en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.

El DETC se ha utilizado en muchos estudios para examinar el papel de la actividad del  $O_2^-$  en los tejidos (Makino et al., 2002; Zou et al., 2001; Majid et al., 2002). Se ha demostrado que DETC utilizado reduce en un 80% la actividad de SOD (Rothstein et al., 1994) y en un estudio in vitro, Pagano et al., (1999), demostraron que los niveles de  $O_2^-$  en los vasos sanguíneos aislados aumentó casi 10 veces durante la aplicación de DETC (10 mmol / L) y fue revertido por el tempol (3 mmol / L).

En este trabajo se han analizado los efectos de la administración crónica vía oral de un inhibidor de la superóxido dismutasa, el DETC, en la presión sanguínea, función endotelial y otras variables morfológicas. Nuestros datos muestran por primera vez que la administración oral de DETC produce un aumento de la PA en ratones, medida por pletismografía. Además, se ha observado que la administración conjunta de los dos inductores de estrés oxidativo, DETC y BSO, tienen efectos aditivos elevando la presión arterial. Todos estos datos demuestran que un aumento de estrés oxidativo, producido por diferentes vías puede actuar como factor desencadenante de hipertensión.

Los resultados obtenidos demuestran que la hipertensión puede resultar del aumento de los niveles de estrés oxidativo en la médula renal. La reducción de la actividad de la SOD en la médula renal por el DETC produce un aumento del radical superóxido, una reducción del flujo sanguíneo renal y un aumento de la presión arterial. Estos datos muestran que el incremento de estrés oxidativo específicamente dentro de la médula renal es el responsable de la hipertensión observada.

Estudios previos han demostrado que la administración intrarrenal de DETC produce un aumento de los niveles de estrés oxidativo en la médula renal. Además, se observó que la infusión intramedular de DETC provoca una reducción inmediata en el flujo sanguíneo medular y en la excreción de sodio a los 30 minutos del inicio de la administración de DETC (Zhou et al., 2001). La presión arterial no se modificó con la infusión aguda durante 2 horas de DETC, pero si se elevó de modo significativo a las 24 horas del inicio de la infusión crónica, acompañado de una reducción del FSM (flujo sanguíneo medular) (Zhou et al., 2001). No se observaron cambios en el flujo sanguíneo cortical con el tratamiento agudo o crónico con DETC, y como la reducción del FSM precedía al aumento en la presión sanguínea, se concluyó que la hipertensión estaba iniciada por cambios en el flujo sanguíneo medular y en el consecuente cambio en la excreción de sodio, aunque no se evaluaron datos de excreción urinaria. Esto datos están en consonancia con otros



trabajos del grupo de Cowley (1997) que demuestran que reducciones del flujo sanguíneo medular en ratas pueden desencadenar y mantener la hipertensión arterial. La infusión intravenosa de DETC no produce cambios en la PAM, FSM ni flujo sanguíneo cortical, por lo que es el aumento del estrés oxidativo directamente en la médula renal es el que produce la hipertensión en este modelo.

Nuestro trabajo también muestra que la hipertensión producida por la administración crónica de DETC no se acompaña de hipertrofia cardíaca o renal en consonancia con los datos obtenidos en los ratones hipertensos tratados con BSO. Igualmente la administración conjunta de ambos agentes estimulantes de estrés oxidativo no se acompañan de cambios en las variables morfológicas.

#### **4. Evaluación del efecto de la inducción del hipertiroidismo en ratones con hipertensión inducida por estrés oxidativo.**

El estado hipertiroidico se acompaña de alteraciones importantes en la función hemodinámica, renal y cardiaca (Bradley et al., 1974; Klein et al., 1995; Larsen et al., 1998). En ratas, la tiroxina (T<sub>4</sub>) produce hipertensión (García Estañ et al., 1995; Klein et al., 1995; Vargas et al., 1991), hipertrofia renal y cardiaca, proteinuria y reduce excreción renal de sodio. Por otro lado, como se ha comentado en reiteradas ocasiones, el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, e insuficiencia renal (Griendling et al., 2000; Wilcox et al., 2002) y ha quedado claro su implicación en la génesis de hipertensión en ratas (Sainz et al., 2005; Schnackenberg et al., 1999). En las ratas con hipertiroidismo hay una menor capacidad para excretar sodio tras sobrecarga salina (Vargas et al., 1991) y parece estar relacionado con las enzimas que regulan el estrés oxidativo a nivel renal. (Moreno et al., 2005)

Los resultados de este trabajo demuestran que la administración de T<sub>4</sub> en ratones a la dosis de 5µg/ratón/día produce hipertensión que se acompaña de hipertrofia cardiaca y renal en consonancia con los trabajos previamente desarrollados en nuestro laboratorio en ratas. Sin embargo

estas observaciones contrastan con los datos previamente descritos de Johns et al., quienes inexplicablemente observaron que la hipertensión renovascular y DOCA-sal en ratones no desarrollaban cardiomegalia tras 4 semanas de inducción de la hipertensión, hallazgos que les llevaron a sugerir que los ratones tienen una sensibilidad reducida al desarrollo de cardiomegalia.

En este estudio también se ha investigado el efecto de la inducción del estrés oxidativo por inhibición de *GSH*, por medio de BSO, en ratones hipertiroides. En las variables analizadas, hemos encontrado que el tratamiento con BSO+T4 en ratones, disminuye la hipertrofia cardíaca y renal generadas en el estado hipertiroides. El posible mecanismo de este efecto puede estar relacionado con una disminución en la expresión de  $\alpha$ -tubulina. Puesto que las proteínas del citoesqueleto son particularmente susceptibles al estrés oxidativo, y la formación de proteínas carboniladas durante la depleción de *GSH* se ha demostrado en el cerebro de ratas, identificando la  $\beta$ -actina y  $\alpha/\beta$ -tubulina como mayor sitio de carbonilación (Bizzozero et al., 2007). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en nuestro laboratorio también hemos podido observar que la administración de BSO previene el efecto estimulante del crecimiento tumoral que posee la T4 (observaciones no publicadas).

En cuanto a las variables hemodinámicas, la PA de los ratones T4, aumenta de modo progresivo a lo largo de las 4 semanas de tratamiento de modo significativo. Este aumento de PAM también se observa en el grupo BSO+T4, pero alcanza una cifra máxima al final del tratamiento menor que en el grupo T4 y mayor que en el grupo BSO.

Estos resultados indican que el tratamiento con BSO en ratones hipertiroideos, atenúa dicho estado, lejos de presentar efectos aditivos en cuanto al desarrollo de hipertensión, hipertrofia cardíaca y renal. Finalmente, de estos datos podemos sugerir, que probablemente el tratamiento con BSO, contrarresta los efectos sistémicos del hipertiroidismo en ratones.

En la figura 12 se representa un resumen de las diferentes acciones del BSO sobre los diferentes mecanismos potencialmente implicados en la patogénesis de este tipo de hipertensión.



Fig.12. Acciones del BSO sobre el aparato cardiovascular y renal (Vargas et al.,2012).

1. Vaziri et al. 2000; 2. Banday et al. 2007; 3. Ganafa et al. 2004; 4. Iwata et al. 2007; 5. Ford et al. 2006; 6. Banday et al. 2008; 7. Banday et al. 2008; 8. Johns et al. 1996; 9. Bayorh et al. 2003; 10. Rodriguez- Gómez et al. 2010; 11. Banday et al. 2008; 12. Banday et al. 2011; 13. Bayorh et al. 2003; 14. Adachi et al. 2000; 15. Laursen et al. 2001.

*"La medicina sólo puede curar  
las enfermedades curables."  
Proverbio Chino*



**SIONES**



1) La administración de BSO en ratones produce una elevación de la presión arterial dosis-dependiente que no se acompaña de hipertrofia cardiaca ni de manifestaciones bioquímicas o morfológicas de cambio renal.

2) El Sistema nervioso simpático juega un papel clave en el desarrollo de la hipertensión producida por la administración de BSO.

3) La administración crónica de DETC , inhibidor de la SOD, determina el desarrollo de hipertensión en ratones sin la presencia de hipertrofia cardiaca.

4) La administración de BSO atenúa las manifestaciones hemodinámicas y morfológicas del hipertiroidismo por un mecanismo que aún está por dilucidar.





*“Que la comida sea tu alimento  
y el alimento tu medicina”  
Hipócrates*



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



**Adachi T, Cohen RA.** Decreased aortic glutathione levels may contribute to impaired nitric oxide-induced relaxation in hypercholesterolaemia. *Br. J. Pharmacol.* 2000;129:1014-1020.

**Andrade J, Haro JM, Jódar E, Luna JD & Vargas F.** Effects of methimazole on low renal mass hypertension: changes on blood pressure and pressor responsiveness to vasoconstrictors. *Pharmacology* 1992;44:315-323.

**Araki S, Hirooka Y, Kishi T, Yasakawa K, Utsumi H, Sunagawa K.** Olmesartan reduces oxidative stress in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats assessed by an in vivo ESR method. *Hypertens Res* 2009;32:1091-1096.

**Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, and Kato K.** Effects of betaadrenergic blockers with different ancillary properties on lipid peroxidation in hyperthyroid rat cardiac muscle. *Endocrinol.* 1989;36:687-694.

**Aw,T.Y.** Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol. Sci.* 2003;18:201-204.

**Banday AA, Fazili FR, Lokhandwala MF.** Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and hypertension via mechanisms that involve nuclear factor- $\kappa$ B and protein kinase C. *J Am Soc Nephrol* .2007;18:1446-1457.

**Banday AA, Lau Y-S, Lokhandwala MF.** Oxidative stress causes renal dopamine D<sub>1</sub> receptor dysfunction and salt-sensitive hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. 2008;51:367-375.

**Banday AA, Lokhandwala MF.** Oxidative stress causes renal angiotensin II type 1 receptor upregulation, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 overstimulation, and hypertension. *Hypertension*. 2011;57:452-459.

**Banday AA, Lokhandwala MF.** Defective renal dopamine D1 receptor function contributes to hyperinsulinemia-mediated hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2006; 28:695-705.

**Banday AA, Lokhandwala MF.** Dopamine receptors and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10:268-275.

**Banday AA, Lokhandwala MF.** Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295:F698-706.

**Banday AA, Muhammad AB, Fazili FR, Lokhandwala MF.** Mechanisms of oxidative stress-induced increase in salt sensitivity and development of hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. 2007;49:664-671.

**Baron AD, Zhu JS, Marshall S, Irsula O, Brechtel G, Keech C.** Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269:E709-15.

**Bayorh MA, Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrov N, Abukhalaf IK.** Effect of losartan on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens*. 2003; 16:387-393.

**Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC.** Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension*. 2001;37:781-786.

**Bizzozero OA, Reyes S, Ziegler J, Smerjac S.** Lipid peroxidation scavengers prevent the carbonylation of cytoskeletal brain proteins induced by glutathione depletion. *Neurochem Res* 2007; 32:2114-2122.

**Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, and Reville P.** The thyroid and the kidney. *Kidney Int*. 1974;6:346-365.

**Campese VM** Oxidative stress and sympathetic activity in hypertension. *Am J Hypertens.* 2010;23:456.

**Campese VM, Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z, and Chiu J.** Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287:H695-H703.

**Campos RR.** Oxidative stress in the brain and arterial hypertension. *Hypertens Res.* 2009; 32:1047-1048.

**Campos RR.** Chronic oxidative stress and sympathetic vasomotor tone in arterial hypertension. *Am J Hypertens.* 2010 Aug;23:820.

**Celsing F, Blomstrand E, Melichna J, Terrados N, Clausen N, Lins PE & Jansson E.** Effect of hyperthyroidism on fibre-type composition, fibre area, glycogen content and enzyme activity in human skeletal muscle. *Clin Physiol.* 1986; 6: 171-181.

**Chamorro V, Wangenstein R, Sainz J, Duarte J, O'Valle F, Osuna A, Vargas F.** Protective effects of angiotensin type I (AT<sub>1</sub>) receptor blockade in low-renin deoxycorticosterone acetate (DOCA)-treated spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci.* 2004; 106; 251-259.

**Chamorro V, Moreno JM, Wangenstein R, Sainz J, Rodriguez-Gomez I, Osuna A, Vargas F.** Effects of deoxycorticosterone on renal vascular reactivity and flow-pressure curve in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:17-26.

**Chan SH, Wu CA, Wu KL, Ho YH, Chang AY, Chan JY.** Transcriptional upregulation of mitochondrial uncoupling protein 2 protects against oxidative stress-associated neurogenic hypertension. *Circ Res.* 2009; 105:886-896.

**Chen X, Patel K, Connors SG, Mendonca M, Welch WJ, Wilcox CS.** Acute antihypertensive action of tempol in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293:H3246-H3253.

**Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL.** Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001; 38:606-611.

**Cowley AW Jr.** Role of the renal medulla in volume and arterial pressure regulation. *Am J Physiol.* 1997;273:R1-R15.



**Cracowski JL, Durand T, Bessard G.** Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications.

*Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23:360 -366.

**Dampney RAL.** Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994; 74:323-364.

**De Gracia, M. C., Osuna, A., O' Valle, F.** Deoxicorticosterone suppresses the effects of losartán in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000; 11: 1995-2000.

**DiBona GF.** Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; 11:197-200.

**Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J.** Protective effects of the flavonid quercetin in the chronic nitric oxide deficient rats. *J. Hypertens.* 2002;20:1843-1854.

**Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J.** Antihypertensive effects of the flavonid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001; 133:117-124.

**Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM.** NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension*. 2005;45:283-287.

**Fang, Y. Z., Yang, S. & Wu, G.** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002; 18: 872-879.

**Feldman EC & Nelson RW.** The thyroid gland. In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, end 2, pp 67-185. Eds WB Saunders & Company. Philadelphia, 1995.

**Feng MG, Dukacz SA, Kline RL.** Selective effect of tempol on renal medullary hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 2001;281:R1420-R1425.

**Fernández V, Videla LA, Tapia G & Israel Y.** Increases in tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radic Res*. 2002; 36: 719-725.

**Ford RJ, Graham DA, Denniss SG, Quadrilatero J, Rush JWE.** Glutathione depletion in vivo enhances contraction and attenuates endothelium-dependent relaxation of isolated rat aorta. *Free Rad Biol Med* . 2006; 40:670-678.

**Fregly MJ, Kim KJ & Hood CI.** Development of hypertension in rats treated with aldosterone-acetate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1969; 15: 229-243.

**Fujita M, Ando K, Nagae A, Fujita T.** Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 2007; 50:360-367.

**Fujita T, Henry WL, Bartter FC, Lake CR, Delea CS.** Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. *Am J Med.* 1980; 69:334-344.

**Fujita, H., Takeda, K., Miki, S.** Chronic angiotensin blockade with candesartan cilexetil in DOCA-salt hypertensive rats reduces cardiac hypertrophy and coronary resistance without affecting blood pressure. *Hypertens. Res.* 1997;20: 263-267.

**Fukunaga, M., Yura, T. and Badr, K. F.** Stimulatory effects of 8-epi-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , an F<sub>2</sub>-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995;26:S51-S52.

**Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R, Villar I, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J.** Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of Deoxycorticosterone acetate-salt - hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2004 ;259:91- 99.

**Galindo P, Rodriguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, Menéndez C, Vargas F, Tamargo J, Santos-Buelga C, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J.** Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS One.* 2012; 7: e32673.2012.

**Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrova N, Abukhalaf IK, Bayorth MA.** Acute inhibition of glutathione biosynthesis alters endothelial function and blood pressure in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;54:217-223.

**Ganafa AA, Walton M, Eatman D, Abukhalaf IK, Bayorh MA.** Amlodipine attenuates oxidative stress-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2004;17:743-748.

**Gao L, Wang W, Li Y-L, Schultz HD, Liu D, Cornish KG and Zucker IH.** Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Cir Res.* 2004; 95:937-944.

**García-Estañ J, Atucha N, Quesada T, and Vargas F.** Involvement of the renin-angiotensin system in the reduced pressure-natriuresis response of hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995;268: E897-E901.

**Giavarotti S, Rodrigues L, Rodrigues T, Junqueira VB & Videla LA.** Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Radic Res* 1998 29 35-42.

**Graettinger JS, Muenster JJ, Silverstone LA & Campbell JA.** A correlation of clinical and hemodynamic studies of patients with hyperthyroidism and with congestive heart failure. *J Clin Invest.* 1959; 40: 1316-1329.

**Gredilla R, Barja G & Lopez-Torres M.** Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. *Free Radic Res* .2001; 35: 417-425.

**Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494-501.

**Griffith, O. W.** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27: 922-935.

**Grossman E.** Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? *Diabetes Care.* 2008;31:S185-S189.

**Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* . 1986; 320: 454-456.

**Hirooka Y.** Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. *Auton Neurosci.* 2008; 142:20-24.

**Hoagland KM, Maier RG, Roman RJ.** Contribution of 20-HETE to the antihypertensive effect of tempol in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2003;41:697-702.

**Hong HJ, Loh SH, and Yen MH.** Suppression of the development of hypertension by the inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 2000; 131: 631-637.

**Iwata C, Xi Wang X, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y.** Buthionine sulfoximine causes endothelium dependent hyper-relaxation and hypoadiponectinemia. *Life Sci.* 2007;80:873-878.

**Johns C, Gavras I, Handy DE, Salomao A, Gavras H.** Models of experimental hipertensión in mice. *Hypertension* . 1996;28:1064-1069.

**Jones, D. P.** Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* 2002; 348: 93-112.

**Karam, H., Heudes, D., Bruneval, P.** Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension.* 1996; 28: 379-385.

**Kim, S., Ohta, K., Hamaguchi, A** Role of angiotensin II in renal injury of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* . 1994;24:195-204.

**Kim KM, Paeng KJ, Hahm JR, Kim DR & Chung BC.** Elevated urinary 8-isoprostaglandin F2a in females with Graves' hyperthyroidism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* .2004; 71: 143-147.

**Kimoto-Kinoshita S, Nishida S, Tomura TT.** Age-related change of antioxidant capacities in the cerebral cortex and hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* .1999; 273:41-44.

**Kishi T, Hirooka Y, Ito K.** Cardiovascular effects of overexpression of endothelial nitric oxide synthase in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39:264-268.

**Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H and Takeshita A.**

Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* .2004; 109: 2357-2362.

**Kishi T, Hirooka Y, Mukai Y, Shimokawa H, Takeshita A.**

Atorvastatin causes depressor and sympatho-inhibitory effects with upregulation of nitric oxide synthases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003; 21:379-386.

**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, 1995, 2247-2262.

**Klein I & Ojamaa K.** Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N*

*Engl J Med* .2001 ;344: 501-509.

**Kline, R. L. and Liu, F.** Modification of pressure natriuresis by long-term

losartan in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* . 1994;24: 467-473.



**Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K.** High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2008;31:2075-2083.

**Koepke JP, DiBona GF.** High sodium intake enhances renal nerve and antinatriuretic responses to stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1985; 7:357-363.

**Kohno, M., Horio, T., Ikeda, M.** Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* 1992;42: 860-866.

**Kojima A, Takahashi Y & Ohno SI.** An elevation of plasma TSH concentration in spontaneously hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975; 149: 661-663.

**Kolo LL, Westfall TC, Macarthur H.** Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H296-H303.

**Kopkan L, Castillo A, Navar LG, Majid DSA.** Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F80-F86.

**Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG.** Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002;40:511-515.

**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: Saunders, 1998, 389-515.

**Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG.** Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997;95:588-593.

**Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA.** Isoprostanes: formation, analysis, and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274:24441-24444.

**Leenen FH, Ruzicka M, Huang BS.** The brain and salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:129-135.

**Lindley TE, Doobay MF, Sharma RV, Davisson RL.** Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure. *Circ Res* 2004;94:402-409.

**Linz, W., Scholkens, B. A. and Ganten, D.** Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 1989;11, 1325-1350.

**Lu, S. C.** Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell Regul.* 2000;36: 95-116.

**Majid DSA, Nishiyama A.** Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension.* 2002; 39: 293-297.

**Makino A, Skelton MM, Zou A-P, Roman RJ, Cowley AW Jr.** Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension* 2002;39:667-672.

**McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF.** Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension.* 1999; 34: 539-545.

**MacParland RP & Rapp JP.** (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) activated adenosine triphosphatase and hypertension in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Clin Exp Hypertens.* 1982; 4: 379-385.ç

**Masseroli M, O'Valle F, Andújar M, Ramírez C, Gómez-Morales M, de Dios Luna J, Aguilar M, Aguilar D, Rodríguez-Puyol M, Del Moral RG.** Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Lab Invest* 78:511-522,1998.

**Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning D.** Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2003;41:1346-1352.

**Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M. and Egido, J.** Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*. 2001; 38: 635-638.

**Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, Russo A.** Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimetics. *Biochemistry* 1990;29:2802-2807.

**Mitchell JB, De Graff W, Kaufman D, Krishna MC, Samuni A, Finkelstein E, Ahn MS, Hahn SM, Gamson J, Russo A.** Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimetic, tempol. *Arch Biochem Biophys* 1991;289:62-70.

**Millatt, L. J., Abdel-Rahman, E. M. and Siragy, H. M.** Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Reg. Pept.* 1999;81:1-10.

**Miyamoto, Y., Akaike, T., Yoshida, M., Goto, S., Horie, H. and Maeda, H.** Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1996;211: 366-373.

**Miyata N, Cowley AW Jr.** Renal intramedullary infusion of L-arginine prevents reduction of medullary blood flow in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension.* 1999;33:445-450.

**Mizumo, K., Tani, M., Hashimoto, S.** Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin II content in spontaneously hypertensive rats. *Life. Sci.* 1992;51: 367-374.

**Morgan, H. E. and Baker, K. M.** Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation.* 1991;83: 13-25.

**Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Osuna A, Bueno P, Vargas F.** Cardiac and renal antioxidant enzymes and effects of tempol in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289:E776-E783.

**Mori T & Cowley AW Jr.** Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose. *Hypertension.* 2004 ;43 :341-346.

**Nagae A, Fujita M, Kawarazaki H, Matsui H, Ando K, Fujita T.** Sympathoexcitation by Oxidative Stress in the Brain Mediates Arterial Pressure Elevation in Obesity-Induced Hypertension. *Circulation*. 2009; 119:978-986.

**Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross JJ, Honjo T, Chien KR.** Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* 2002;415:171-175.

**Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sakaki J, Sato T, Inone M.** Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10045-10048.

**Navar LG.** The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Kidney Int*. 2004;65:1522-32.

**Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian R-X, Kimura S, Abe Y.** Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension* 2001;37:77-83.

**Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT, Oliveira TGC, Boim MA, Campos RR.** Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular

hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. *Am J Hypertens* 2010;23:473-480.

**Ohtsuki T, Matsumoto M, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T.** Mitochondrial lipid peroxidation and superoxide dismutase in rat hypertensive target organs. *Am J Physiol* 1995; 268:H1418-H1421.

**Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Martins PJ, D'Almeida V, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR.** Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 2008; 21:98-104.

**Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR.** Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 2009; 22:484-492.

**Ono A, Kuwaki T, Kumada M, Fujita T.** Differential central modulation of the baroreflex by salt loading in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 29:808-814.

**Ortiz MC, Manríquez MC, Romero JC, Juncos LA.** Antioxidant block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension* 2001;38:655-659.

**Pagano PJ, Griswold MC, Najibi S, Marklund SL, Cohen Ra.** Resistance of endothelium-dependent relaxation to elevation of  $O_2^-$  levels in rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 1999, 277:H2109-2114.

**Parry CH.** Collections from the unpublished papers of the late Caleb Hilliel Parry. *Dis Heart*. 1825;2 :111-165.

**Pechanova O, Dobesova Z, Cejka J, Kunes J, Zicha J.** Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *J Hypertens* 2004; 22: 167-173.

**Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A.** Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*. 2009;61:67-75.

**Raij L, Dalmaso AP, Staley NA, Fish AJ.** Renal injury in DOCA-salt hypertensive C5-sufficient and C5-deficient mice. *Kidney Int*. 1989;36:582-592.

**Reckelhoff J, Romero JC.** Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol* 2003;284:R893-R912.

**Roberts, L. J. and Morrow, J. D.** The generation and actions of isoprostanes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1997: 1345,121-135.



**Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ.** Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension*. 2000 Sep;36:423-9.

**Rodríguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ.** Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:F606-16.

**Rothstein JD, Bristol LA, Soler B, Brown RH, Kuncel RW.** Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:4155-4159.

**Romero, J. C. and Reckelhoff, J. F.** Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 1999; 34: 943-949.

**Sainz J, Wangensteen R, Rodríguez-Go´mez 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* . 2005;18: 871-877.

**Sawant BU, Nadkarni GD, Thakare UR, Joseph LJ & Rajan MG.** Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in kidney of hypothyroid and hyperthyroid rats. *Indian J Exp Biol* 2003;41:1334-1337.

**Schiffrin EL.** Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* . 2002;15:115S-122S.

**Schnackenberg CG and Wilcox CS.** Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-isoprostaglandin F2a. *Hypertension* .1999; 33: 424-428.

**Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998 ;32:59-64.

**Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Hitomi H, Kiyomoto H, Takahashi N, Kimura S, Kohno M, Abe Y.** Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003; 41:266-273.

**Shokoji T, Fujisawa Y, Kimura S, Rahman M, Kiyomoto H, Matsubara K, Moriwaki K, Aki Y, Miyatake A, Kohno M, Abe Y, Nishiyama A.** Effects of local administrations of tempol and diethyldithio-carbamic on peripheral nerve activity. *Hypertension* . 2004;44:236-243.

**Sewerynek J, Wiktorska J, Novak D & Lewinski A.** Methimazole protection against oxidative stress induced by hyperthyroidism in Graves disease. *Endocr Regul* 2000; 34: 83-89.

**Seymen HO, Civelek S, Seven A, Yigit G, Hatemi H & Burkak G.** Iron supplementation in experimental hyperthyroidism: effects of oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Yonsei Med J* 2004;45:413-418.

**Seymen HO, Seven A, Civelek S, Yigit G, Hatemi H & Burkak G.** Evaluation of antioxidant status in liver tissues: effects of iron supplementation in experimental hyperthyroidism. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1999;10: 315-325.

**Suzuki, H., Swee, A., Zweifach, B. W. and Schmid-Schönbein, G.W.** In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension* . 1995;25: 1083-1089.

**Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Versari D, Salvetti G, Magagna A, Salvetti A.** Calcium antagonist treatment by lercanidipine prevents hyperpolarization in essential hypertension. *Hypertension* . 2003;41:950 - 955.

**Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ II, Hoover RL, Badr KF.** Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub>, in the rat: evidence for interaction with thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J Clin Invest.* 1992;90:136-141.

**Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003;42:1075-81.

**Tapia G, Cornejo P, Fernández V & Videla LA.** Protein oxidation in the thyroid hormona-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 1999; 106: 209-214.

**Tesfamariam B, Cohen RA.** Role of superoxide anion and endothelium in vasoconstrictor action of prostaglandin endoperoxide. *Am J Physiol* 1992;262:H1915-H1919.

**Threatte RM, Fregly MJ & Field FP.** Interrelationship among blood pressure, renal function, thyroid activity and renal thyroid depressing factor in renal hypertensive rats. *Pharmacology* 1982;24: 201-210.

**Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H.** The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 2003;57: 145-155.

**Trippodo, N. and Frolich, E.** Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. *Circ. Res.* 1981;**48**: 309-319.

**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 hypothyroid rats. *Clin Sci (Colch)*. 1991;81: 471-476,

**Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Alvarez-Guerra M, Osuna A, García-Estañ J.** Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol*. 2006; 154:197-212.

**Vargas F, Osuna A, Fernández-Rivas A.** Vascular reactivity and flow-pressure curve in isolated kidneys from N-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *J. Hypertens*. 1996;14:373-379.

**Vargas F, García del Rio C, Luna JD, Haro JM & Osorio C.** Studies on thyroid activity in deoxycorticosterone-salt and Goldblatt two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118:22-30.

**Vargas F, Sabio JM, Luna JD.** Contribution of endothelium-derived relaxing factors to the acetylcholine-induced vasodilatation in the rat kidney. *Cardiovasc. Res.* 1994;28: 1373-1377.

**Vaziri ND.** Pathogenesis of lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *J Hypertens Suppl.* 2002;20:S15-20.

**Vaziri ND.** Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 2004 Sep;24:469-73.

**Vaziri ND.** Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13: 93-99.

**Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK.** Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003 Jan;63:179-85

**Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, and Gonick HC.** Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension. Effect of lazaroid therapy. *Kidney Int.* 1997; 52: 1042-1046.

**Vaziri ND, Ding Y, and Ni Z.** Compensatory up-regulation of nitric oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298: 679-685.

**Vaziri ND, Liang K, and Ding Y.** Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int* . 1999;56: 1492-1498.

**Vaziri ND, Lin C-Y, Farmand F, Sindhu RK.** Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int* 2003;63:186-194.

**Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL:** Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* . 2000;36:957-964.

**Vaziri ND, Oveisi F, Ding Y.** Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int*. 1998;53:1748-54.

**Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe G.** Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature clinical practice nephrology*. 2006;2: 582-593.

**Vaziri, XU, Wang F. Oveisi and B. Rad.** Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 2000; 36:142-146.

**Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S & De Leo T.** Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 1997; 155: 151-157.

**Wang, X. Q.** Association of renal injury with nitricoxide deficiency in aged SHR: prevention of hypertension control with AT1 blockade. *Kidney Int.* 2002;62: 914-921.

**Wangensteen R, O'Valle F, Del Moral RG, Vargas F, Osuna A.** Chronic  $\alpha_1$ -adrenergic blockade improves blood pressure and renal injury in L-NAME and low-renin L-NAME-DOCA hypertensive rats. *Med Sci Monit* 2002; 8:BR378-384.

**Wangensteen R, Rodriguez-Gomez, Moreno JM, Alvarez-Guerra M, Osuna A, Vargas F.** Effects of chronic treatment with 7-nitroindazole in hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 2006; 291:R1376-R1382.

**Ward NC, Croft KD.** Hypertension and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33:872-876.

**Welch WJ, Tojo A, Wilcox CS.** Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feed-back in SHR. *Am J Physiol* 2000; 278: F769-F776.



**Werner SC, Manger WM, Radichevich MW & Storf IV.** Excessive thyrotropin concentrations in the circulation of the spontaneously hypertensive rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 148:1013-1117.

**Wright GL, Knecht E, Badger D, Samueloff S, Toraason M & Duker-Dobos F.** Oxygen consumption in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;159:449-452.

**Wilcox CS.** Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep.* 2002; 4: 160-166.

**Wilcox CS.** Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R913-35.

**Wu G, Fang YZ, Yang S.** Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 2004;134:489-492.

**Xue B, Zhao Y, Johnson AK, Hay M.** Central estrogen inhibition of angiotensin II-induced hypertension in male mice and the role of reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H1025-H1032.

**Xu H, Fink GD, Galligan JJ.** Nitric oxide-independent effects of Tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H885-H892.

**Xu Z, Yang J, Yu J, Yin Z, Sun W, Li J.** Effects of BSO, GSH, Vit-C and DMPS on the nephrotoxicity of mercury. *Toxicol Ind Health.* 2007;23:403-410.

**Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN.** Fibulin-5 is an elastic-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* 2002;415:168-171.

**Ye S-H, Zhong H, Yanamadala S, Campese VM.** Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. *Hypertension* 2006;48:309-315.

**Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Abe Y.** ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction. *Hypertension.* 2004;43:117-124.

**Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J.** Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001;38: 1395-1399.

**Zanzinger J, Czachurski J.** Chronic oxidative stress in the RVLM modulates sympathetic control of circulation in pigs. *Pflugers Arch* 2000; 439:489-494.

**Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, and Davisson RL.** Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 2002; 91:1038-1045.

**Zhou, X. J., Vaziri, N. D., Zhang, J., Wang, H. W. and Zhuo, J. L., Imig, J. D., Hammond, T. J., Orengo, S., Benes, E. and Navar, L. G.** Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT1 receptor. *Hypertension*. 2002;39: 116-121.

**Zhou XJ, Vaziri ND, Wang XQ, Fred G. Silva FG, Laszik Z.** Nitric oxide synthase expression in hypertension induced by inhibition of glutathione synthase. *J Pharm Exp Ther* . 2002;300:762-767.

**Zou AP, Li N, and Cowley AW Jr.** Production and action of superoxide in renal medulla. *Hypertension*. 2001; 37: 547-553.

**Zou AP, Cowley AW Jr.** Nitric oxide in renal cortex and medulla: an in vivo microdialysis study. *Hypertension*. 1997;29:194-198.