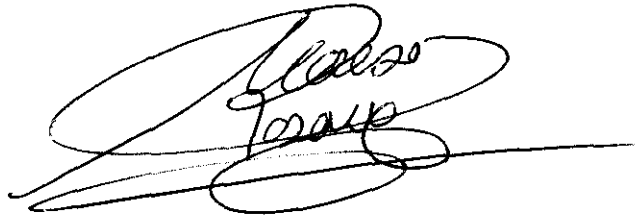


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA  
FUNCION VASCULAR EN LA RATA  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSA:  
CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA  
RENINA-ANGIOTENSINA**



**TESIS DOCTORAL**

**ROSAURA MAESO MARTIN**

**MADRID, 1998**





DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
Teléfono: 394 14 39 - Fax: 394 16 28  
CIUDAD UNIVESITARIA  
28040 MADRID

**Dr. D. VICENTE LAHERA JULIA**, Profesor Titular del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y

**Dra. Dña. VICTORIA CACHOFEIRO RAMOS**, Profesora Titular del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo de investigación titulado **"Efectos del envejecimiento sobre la función vascular en la rata espontáneamente hipertensa: Consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina"** constituye la memoria presentada por Dña. Rosaura Maeso Martín para optar al título de Doctor, y que ha sido realizada bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones para ser defendida ante un tribunal. Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 20 de Abril de 1998.

Fdo: Vicente Lahera Juliá

Fdo: Victoria Cachofeiro Ramos

*A mi familia*

*A Pedro*

*ABREVIATURAS*

---

<b>A (1-7)</b>	Angiotensina 1-7
<b>A</b>	Adrenalina
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AI</b>	Angiotensina I
<b>AII</b>	Angiotensina II
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AT</b>	Receptor de angiotensina
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>bFGF</b>	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>COO</b>	Ciclooxigenasa
<b>DAG</b>	Diacil glicerol
<b>ECA</b>	Enzima de conversión de angiotensina
<b>EDCFs</b>	Factores vasoconstrictores derivados del endotelio
<b>EDHF</b>	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
<b>ET</b>	Endotelina
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FE</b>	Fenilefrina
<b>FSR</b>	Flujo sanguíneo renal
<b>GMPc</b>	Guanidín monofosfato cíclico
<b>IECA</b>	Inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>LNAME</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
<b>LNMMA</b>	N-monometil-L-arginina
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>NOS</b>	NO sintasa
<b>NPS</b>	Nitroprusiato sódico

<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAF</b>	Factor activador de las plaquetas
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>SHR</b>	Rata espontáneamente hipertensa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático
<b>TFG</b>	Tasa de filtración glomerular
<b>TGF<sub>β</sub></b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>t-PA</b>	Activador de plasminógeno tisular
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>WKY</b>	Rata Wistar-Kyoto

*INDICE*

---

INTRODUCCION .....	1
1.- Pared vascular .....	2
1.1.- Estructura de la pared vascular .....	2
1.2.- Regulación del tono y del crecimiento vascular .....	2
1.2.1.- Sistema nervioso simpático y catecolaminas .....	3
1.2.1.1.- Biosíntesis y regulación de las catecolaminas .....	4
1.2.1.2.- Mecanismo de acción y acciones de las catecolaminas sobre el músculo liso vascular .....	5
1.2.2.- Endotelio vascular y factores endoteliales .....	7
1.2.2.1.- Prostaciclina .....	9
1.2.2.1.1.- Biosíntesis y regulación de la prostaciclina .....	9
1.2.2.1.2.- Mecanismo de acción y acciones de la prostaciclina sobre el músculo liso vascular .....	10
1.2.2.2.- Tromboxano A <sub>2</sub> .....	11
1.2.2.2.1.- Biosíntesis y regulación del tromboxano A <sub>2</sub> .....	11
1.2.2.2.2.- Mecanismo de acción y acciones del tromboxano A <sub>2</sub> sobre el músculo liso vascular .....	12
1.2.2.3.- Oxido nítrico .....	13
1.2.2.3.1.- Biosíntesis y regulación del óxido nítrico .....	14
1.2.2.3.2.- Mecanismo de acción y acciones del NO sobre el músculo liso vascular .....	16
1.2.2.4.- Endotelina .....	19
1.2.2.4.1.- Biosíntesis y regulación de la endotelina .....	19
1.2.2.4.2.- Mecanismo de acción y acciones de la endotelina sobre el músculo liso vascular .....	20
1.2.2.5.- Factor hiperpolarizante derivado del endotelio .....	22
1.2.2.6.- Factores constrictores derivados del endotelio .....	24
2.- Fisiología del sistema renina-angiotensina .....	25
2.1.- Descripción del sistema renina-angiotensina .....	25
2.1.1.- Vías de síntesis de angiotensina II distintas del sistema renina-angiotensina .....	26
2.1.2.- Sistemas renina-angiotensina circulante y tisulares .....	28
2.2.- Renina .....	29
2.2.1.- Síntesis .....	29
2.2.2.- Regulación .....	30
2.2.2.1.- Mecanismo de la mácula densa .....	30



2.2.2.2.- Mecanismo barorreceptor-presión de perfusión renal . . . . .	31
2.2.2.3.- Sistema nervioso simpático . . . . .	31
2.2.2.4.- Regulación por la angiotensina II . . . . .	32
2.3.- Angiotensinógeno . . . . .	32
2.4.- Angiotensina I . . . . .	33
2.5.- Enzima de conversión de angiotensina . . . . .	33
2.6.- Angiotensina II . . . . .	34
2.6.1.- Receptores de angiotensina II . . . . .	34
2.6.1.1.- Receptores AT <sub>1</sub> . . . . .	35
2.6.1.2.- Receptores AT <sub>2</sub> . . . . .	35
2.6.2.- Acciones de la angiotensina II . . . . .	36
2.6.2.1.- Acciones de la angiotensina II sobre el sistema nervioso central y periférico . . . . .	37
2.6.2.2.- Acciones vasculares de la angiotensina II . . . . .	38
2.6.2.2.1.- Acciones sobre la contracción del músculo liso vascular . . . . .	38
2.6.2.2.2.- Acciones sobre el crecimiento vascular . . . . .	39
2.6.2.2.3.- Acciones sobre el proceso aterogénico . . . . .	40
2.6.2.3.- Acciones de la angiotensina II sobre el corazón . . . . .	40
2.6.2.3.1.- Acciones sobre la función cardíaca . . . . .	40
2.6.2.3.2.- Acciones sobre el crecimiento miocárdico . . . . .	41
2.6.2.4.- Acciones renales de la angiotensina II . . . . .	41
2.6.2.4.1.- Acciones sobre la hemodinámica renal y la filtración glomerular . . . . .	41
2.6.2.4.2.- Acciones tubulares . . . . .	42
2.6.2.5.- Acciones de la angiotensina II sobre la corteza adrenal . . . . .	43
2.7.- Interrelaciones del sistema renina-angiotensina con otros factores vasoactivos . . . . .	44
2.8.- Intervención farmacológica sobre el sistema renina-angiotensina . . . . .	46
2.8.1.- Inhibidores de la renina . . . . .	47
2.8.2.- Inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina . . . . .	48
2.8.3.- Antagonistas de los receptores de AII . . . . .	49
3.- Modificaciones de la función vascular y concepto de disfunción endotelial . . . . .	50
3.1.- Efectos vasculares del envejecimiento . . . . .	51
3.2.- Efectos vasculares de la hipertensión . . . . .	54
3.3.- Efectos vasculares del envejecimiento en la hipertensión . . . . .	58

OBJETIVOS .....	60
MATERIALES Y METODOS .....	62
1.- Animales de experimentación .....	63
2.- Metodología .....	63
2.1.- Determinación de la presión arterial sistólica .....	63
2.1.1.- Validación del método pletismográfico para la medida de la presión arterial sistólica .....	64
2.2.- Determinación de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos .....	64
2.3.- Reactividad vascular .....	65
2.3.1.- Agentes vasoactivos utilizados .....	67
2.2.2.- Preparación de las disoluciones .....	67
2.4.- Determinación de la masa cardíaca y aórtica .....	67
3.- Diseño experimental .....	68
3.1.- Efectos del envejecimiento sobre la función vascular, la presión arterial, los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, y la masa cardíaca y aórtica en la SHR .....	68
3.1.1.- Efectos del envejecimiento sobre la reactividad vascular en la SHR ..	68
3.1.1.1.- Estudio de la respuesta vasoconstrictora .....	68
3.1.1.2.- Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora .....	70
3.1.1.3.- Estudio de la respuesta vasodilatadora .....	70
3.2.- Consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina en los efectos del envejecimiento sobre la función vascular, la presión arterial, los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, y la masa cardíaca y aórtica en la SHR .....	71
3.2.1.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas .....	72
3.2.1.1.- Estudio de la respuesta vasoconstrictora .....	73
3.2.1.2.- Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora .....	73
3.2.1.3.- Estudio de la respuesta vasodilatadora .....	74
3.2.2.- Consecuencias de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas .....	74
3.2.2.1.- Estudio de la respuesta vasoconstrictora .....	75
3.2.2.2.- Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora .....	75

3.2.2.3.- Estudio de la respuesta vasodilatadora	76
4.- Análisis estadístico	76
<b>RESULTADOS</b>	<b>78</b>
.	
1.- Efecto del envejecimiento sobre la presión arterial en la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina	79
1.1.- Efecto del envejecimiento sobre la presión arterial en la SHR	79
1.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la presión arterial en las SHR adultas y viejas	79
2.- Efecto del envejecimiento sobre los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos en la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina	80
2.1.- Efecto del envejecimiento sobre los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos en la SHR	80
2.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos en las SHR adultas y viejas	80
3.- Efectos del envejecimiento sobre la masa cardíaca y aórtica en la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina	80
3.1.- Efectos del envejecimiento sobre la masa cardíaca y aórtica en la SHR	80
3.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la masa cardíaca y aórtica en las SHR adultas y viejas	81
4.- Efectos del envejecimiento sobre la reactividad vascular en la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina	81
4.1.- Efectos del envejecimiento sobre la reactividad vascular en la SHR	81
4.1.1.- Efecto del envejecimiento sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio	81
4.1.2.- Efecto del envejecimiento sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores derivados del endotelio	82
4.1.3.- Efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora en el envejecimiento	83
4.1.4.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta vasodilatadora	84
4.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas	85
4.2.1.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio	85

4.2.2.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores derivados del endotelio . . . . .	86
4.2.3.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasoconstrictora . . . . .	87
4.2.4.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasodilatadora . . . . .	88
4.3.- Consecuencias de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas . . . . .	89
4.3.1.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre el tono aórtico basal y precontraído con fenilefrina . . . . .	89
4.3.2.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio . . . . .	90
4.3.3.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores derivados del endotelio . . . . .	91
4.3.4.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones inducidas por la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasoconstrictora . . . . .	92
4.3.5.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasodilatadora . . . . .	93
 DISCUSION . . . . .	 128
 1.- Efecto del envejecimiento sobre la presión arterial en la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina . . . . .	 129
1.1.- Efecto del envejecimiento sobre la presión arterial en la SHR . . . . .	129
1.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la presión arterial en las SHR adultas y viejas . . . . .	129
2.- Efectos del envejecimiento sobre la masa cardíaca y aórtica en la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina . . . . .	134
2.1.- Efectos del envejecimiento sobre la masa cardíaca y aórtica en la SHR . . . . .	134
2.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la masa cardíaca y aórtica en las SHR adultas y viejas . . . . .	137
3.- Efectos del envejecimiento sobre la reactividad vascular de la SHR: consecuencias del bloqueo del sistema renina-angiotensina . . . . .	141
3.1.- Efectos del envejecimiento sobre la reactividad vascular en la SHR . . . . .	141
3.1.1.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta vasoconstrictora . . . . .	141

3.1.2.- Efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora en el envejecimiento .....	146
3.1.3.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta vasodilatadora .....	148
3.2.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas .....	152
3.2.1.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasoconstrictora .....	152
3.2.2.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones del tratamiento crónico sobre la respuesta vasoconstrictora .....	157
3.2.3.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasodilatadora .....	158
3.3.- Consecuencias de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas .....	161
3.3.1.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasoconstrictora .....	161
3.3.2.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones inducidas por la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasoconstrictora .....	167
3.3.3.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasodilatadora .....	170
CONCLUSIONES .....	173
BIBLIOGRAFIA .....	175

## *INTRODUCCION*

---

## **1.- PARED VASCULAR**

### **1.1.- ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR**

Los vasos sanguíneos no son sólo simples conductos que transportan la sangre y con ella los nutrientes y el oxígeno a los tejidos, sino que las distintas células que componen la pared vascular ejercen diversas funciones que contribuyen a mantener la homeostasis del sistema cardiovascular. Desde un punto de vista histológico, la organización básica de la pared arterial está formada por tres capas celulares concéntricas: la íntima, la media y la adventicia.

La túnica íntima es la más interna, se encuentra en contacto directo con la sangre circulante y está formada por una monocapa de células endoteliales con su eje mayor orientado longitudinalmente, que constituye el endotelio vascular. La capa media o túnica media está compuesta fundamentalmente por células musculares lisas fusiformes dispuestas circularmente formando varias capas alrededor de la circunferencia del vaso, algunos fibroblastos y fibras de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular intersticial. Tanto las células endoteliales como las musculares lisas son responsables de la producción y deposición de los componentes de la matriz extracelular vascular. La capa externa corresponde a la túnica adventicia. La adventicia es una capa poco definida de tejido conectivo constituida por fibroblastos y haces de colágeno orientados longitudinalmente, así como por una red laxa de fibras elásticas delgadas y numerosas terminaciones nerviosas. La capa íntima y la media están separadas por una lámina elástica interna, y la capa media y la adventicia por una lámina elástica externa. Los distintos componentes de la pared de los vasos sanguíneos pueden variar en su proporción y tamaño dependiendo de la función ejercida por cada tipo de vaso y de su ubicación en el árbol vascular.

### **1.2.- REGULACION DEL TONO Y DEL CRECIMIENTO VASCULAR**

La función vascular está regulada por distintos sistemas extravasculares y por la propia pared del vaso, principalmente por el endotelio, que van a controlar tanto el tono vasomotor, como el crecimiento de las células del músculo liso, los procesos de agregación

plaquetaria y coagulación o las interacciones de los leucocitos con la pared vascular.

En el control del tono vascular participan el sistema nervioso central (SNC) y periférico y un gran número de factores humorales que tienen diversos efectos sobre el sistema circulatorio. El sistema nervioso puede regular el tono vascular por medio de varios centros de control encefálico y del sistema nervioso autónomo a través de distintos arcos reflejos. El sistema nervioso simpático (SNS) desempeña un papel principal en el control del tono vascular, generalmente mediante efectos selectivos y diferenciales sobre lechos vasculares específicos, aunque también tiene importantes efectos sobre la función cardíaca. El sistema nervioso parasimpático, a diferencia del SNS, sólo desempeña un papel menor en la regulación del tono vascular, siendo su acción más relevante sobre el control de la frecuencia cardíaca.

Existen una gran cantidad de factores humorales que pueden ejercer tanto efectos vasoconstrictores como vasodilatadores sobre el árbol vascular. Entre ellos están las catecolaminas, la angiotensina II (AII), la vasopresina, las cininas, las prostaglandinas (PGs), el péptido natriurético auricular, la serotonina, la histamina, los péptidos opioides, la neurotensina y el péptido intestinal vasoactivo, así como los factores derivados del endotelio vascular. Algunas de estas hormonas son transportadas por la sangre a todo el organismo y tienen claras acciones sistémicas, como las catecolaminas o la AII. Otras se forman en tejidos específicos y producen principalmente efectos circulatorios locales, como las PGs, las cininas o los factores endoteliales. Entre los factores humorales más importantes que afectan a la función circulatoria y participan en el control del tono y el crecimiento vascular se encuentran las catecolaminas, los factores derivados del endotelio y el sistema renina-angiotensina (SRA), del que hablaremos en un apartado distinto dada su especial relevancia.

### **1.2.1.- Sistema Nervioso Simpático y Catecolaminas**

Las neuronas postganglionares simpáticas inervan los principales órganos implicados en la función del sistema cardiovascular como la mayoría de los vasos sanguíneos, las glándulas adrenales, el riñón y el corazón. La estimulación del SNS produce un efecto



cronotrópico e inotrópico positivo en el corazón, aumentando la frecuencia y la fuerza de contracción cardíacas. En los vasos sanguíneos sistémicos la estimulación simpática produce mayoritariamente un efecto vasoconstrictor marcado que se traduce en un aumento de las resistencias periféricas totales. A causa de sus efectos sobre el corazón y sobre las resistencias periféricas la activación simpática produce una considerable elevación de la presión arterial (PA). También existe una descarga tónica de las fibras eferentes simpáticas que es responsable de la constricción tónica en los vasos de resistencia (Onesti y cols., 1976). Este tono simpático basal va a mantener parcialmente contraídas casi todas las arteriolas sistémicas, lo que permite que se pueda producir tanto un aumento de la vasoconstricción al incrementar la actividad simpática o por acción de otros sistemas vasoconstrictores, como un efecto vasodilatador por una inhibición simpática o por los factores vasodilatadores. Por esta razón, su papel en la regulación del tono vascular es fundamental.

La estimulación de los nervios simpáticos que inervan las glándulas adrenales produce la liberación de grandes cantidades de catecolaminas a la sangre, donde éstas son transportadas a los distintos órganos y tejidos ejerciendo sus efectos, que se suman a los inducidos directamente por la estimulación simpática. Además la activación del SNS a nivel renal, cuyas fibras se encuentran inervando directamente el aparato yuxtaglomerular, es capaz de estimular la liberación de renina con la consiguiente formación de AII, que no sólo amplifica los efectos del SNS, sino que también afecta decisivamente a la función cardiovascular y renal a largo plazo.

#### ***1.2.1.1.- Biosíntesis y regulación de las catecolaminas***

Las terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares que inervan los distintos órganos diana incluidos los vasos sanguíneos son en su mayoría fibras adrenérgicas que liberan noradrenalina (NA). Las fibras nerviosas simpáticas que van a las glándulas adrenales terminan directamente sobre células neuronales modificadas que secretan también NA y principalmente adrenalina (A) al torrente sanguíneo. Por tanto, cuando se produce un descenso de la PA y a través de la activación refleja, tiene lugar la estimulación del SNS que produce además de los efectos cardiocirculatorios mencionados anteriormente, la liberación

de NA y A por parte de las glándulas adrenales.

La síntesis de NA en las terminaciones nerviosas simpáticas se produce a partir de la tirosina generándose primero la dopa y luego la dopamina, que sufre una hidroxilación para formar la NA en el interior de las vesículas donde queda almacenada. En la glándula adrenal esta reacción continua con una metilación hasta transformar aproximadamente el 80% de la NA en A. La síntesis y liberación de las catecolaminas por parte de la glándula adrenal no sólo depende de la estimulación simpática, sino que también puede verse modulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y los glucocorticoides que varían las proporciones de NA y A sintetizadas y por distintos factores humorales que pueden estimular su síntesis y liberación como la angiotensina I (AI) (Goodfriend, 1983) y la AII (Hano, 1994) o la Endotelina (ET) (Boarder y Marriot, 1989).

#### ***2.1.1.2.- Mecanismo de acción y acciones de las catecolaminas sobre el músculo liso vascular***

La NA liberada por las terminaciones nerviosas adrenérgicas, así como la NA y A circulantes se van a unir a receptores específicos a través de los cuales ejercen sus acciones en los diferentes órganos diana. Existen dos tipos principales de receptores adrenérgicos, conocidos como receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , de los que se han descrito a su vez dos subtipos,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , y  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . La NA estimula principalmente los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y en menor proporción los  $\beta$ -adrenérgicos, mientras que la A es capaz de estimular por igual ambos tipos de receptores. La activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos implica la movilización del calcio de los depósitos intracelulares, así como su entrada desde el espacio extracelular conduciendo al aumento de la concentración citosólica de calcio, que da lugar a la contracción del músculo liso vascular (Minneman, 1988). También los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos producen vasoconstricción, aunque ésta parece estar mediada por la inhibición de la adenilato ciclasa (Jakobs y cols., 1976). Al contrario que éstos, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos activan la adenilato ciclasa conduciendo al incremento de los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Lefkowitz y cols., 1983) y son los responsables de la respuesta vasodilatadora adrenérgica que tiene lugar en determinadas situaciones. Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son más sensibles a concentraciones de ligando

más bajas, por lo que la A actúa primeramente como un vasodilatador sobre los vasos coronarios y los del músculo esquelético activando éstos. A concentraciones más altas predomina su acción vasoconstrictora activando los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos más numerosos.

Las acciones de las catecolaminas circulantes se superponen a las que realiza el SNS. Por lo general, la NA secretada directamente a un tejido sólo permanece activa durante unos pocos segundos y ésta puede eliminarse del lugar donde ha sido liberada principalmente por recaptación al interior de las propias terminaciones nerviosas y por destrucción enzimática por la catecol-O-metiltransferasa y la monoamino-oxidasa. Sin embargo, la NA y la A secretadas a la sangre por la glándula adrenal permanecen activas durante más tiempo, debido a que las hormonas se eliminan lentamente de la sangre, por lo que sus efectos son mucho más prolongados, durando hasta 1 o 2 minutos después de que haya cesado la estimulación. La NA circulante ejerce las mismas acciones que la liberada por los terminales nerviosos, mediadas principalmente por los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. La A circulante tiene efectos similares a la NA, pero debido a su mayor afinidad por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, ésta tiene un mayor efecto estimulador de la actividad cardíaca, pero produce una menor contracción de los vasos sanguíneos musculares teniendo un menor efecto sobre las resistencias periféricas, a diferencia de la NA que provoca una vasoconstricción mucho más intensa. La estimulación de las glándulas adrenales y la secreción de ambas catecolaminas circulantes por tanto, tiene dos características con respecto a la estimulación simpática: que sus efectos son más duraderos, entre 5 y 10 veces más, y que dado que se transportan en sangre pueden ejercerlos en lugares donde no llega la inervación vegetativa (Buckley y Ferrario, 1987).

Las catecolaminas no sólo regulan el tono vascular, sino que también tienen efectos sobre la estructura del sistema cardiovascular en determinadas situaciones fisiopatológicas y la hiperactividad nerviosa simpática es considerada como un factor inductor de la hipertrofia cardiovascular. Estudios *in vivo* han demostrado que la hipertrofia y la fibrosis cardíaca pueden ocurrir tras la administración de catecolaminas o agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Gavras y cols., 1975; Farivar y cols., 1995). También algunos estudios *in vitro* han mostrado efectos directos de la NA sobre la hipertrofia de los cardiomiocitos (Simpson y

cols., 1990) y los fibroblastos cardíacos (Bhambi y Eghbali., 1991). A nivel vascular se ha descrito que tanto la NA como los agonistas adrenérgicos estimulan el crecimiento de las células del músculo liso arterial *in vivo* e *in vitro* (Blaes y Bloissel., 1983; Bell y Madri., 1989; Cavallero y cols., 1973). Además, el SNS y las catecolaminas endógenas también parecen estar implicadas en la regulación de los procesos de crecimiento de la pared de vascular, ya que existe de una correlación entre el desarrollo de la inervación simpática y el desarrollo de la hipertrofia de la media arterial en ratas normotensas y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Scott y Pang, 1983) y se ha demostrado que la denervación simpática o la simpatectomía química e inmunológica inhiben la proliferación de las células musculares lisas (Bevan, 1975; Lee y cols., 1987).

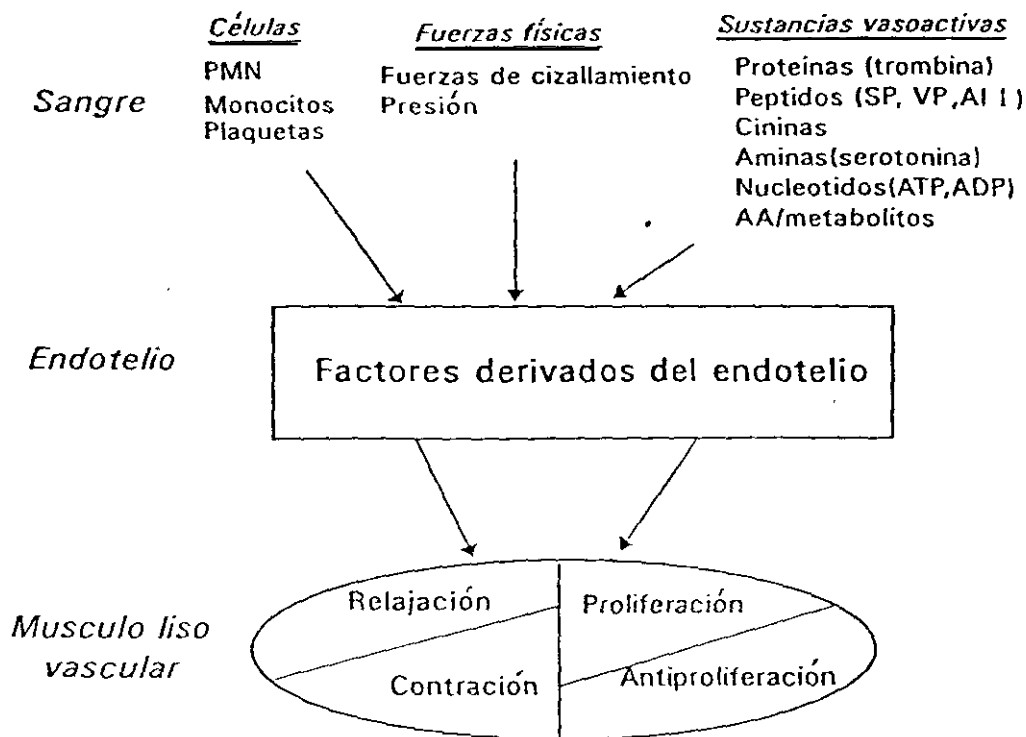
### 1.2.2.- Endotelio vascular y factores endoteliales

La cara luminal de los vasos sanguíneos como ya se ha mencionado está tapizada por una capa de células endoteliales continua que constituye el endotelio vascular. Tradicionalmente el endotelio fue considerado exclusivamente como una barrera física que separaba la sangre de la pared vascular con escasa actividad metabólica. Sin embargo, actualmente se sabe que el endotelio presenta una elevada actividad celular con una gran cantidad de funciones metabólicas y enzimáticas relacionadas con factores biológicamente activos y que dicha estructura desempeña un papel esencial como modulador de diversos procesos que afectan a la función y a la estructura de la pared vascular (Furchgott y Vanhoutte, 1989)

Así, las células endoteliales pueden activar y desactivar hormonas circulantes, ya que en ellas se produce la internalización y degradación de la NA y serotonina circulantes por la monoamino-oxidasa, la conversión de la AI en AII y la degradación de la bradicinina (Bk) por acción de la enzima de conversión de angiotensina (ECA) o la Cininasa II. Además el endotelio es capaz de sintetizar y liberar a la sangre numerosos factores vasoactivos como la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y factores constrictores derivados del endotelio (EDCFs) como el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) o la endotelina-1 (ET-1). Las células endoteliales también constituyen una fuente de producción de radicales libres de oxígeno,

heparinoides, el factor transformante  $\beta$  de crecimiento (TGF $\beta$ ), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el activador del plasminógeno tisular (t-PA), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión de monocitos y otros.

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica idónea entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y el músculo liso vascular. Las células endoteliales son capaces de detectar variaciones de tipo mecánico como cambios hemodinámicos de la presión o las fuerzas de cizallamiento de la sangre, químico como la presión de oxígeno, humorales como las modificaciones de los factores circulantes o locales y cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos. El endotelio va a traducir dichas modificaciones respondiendo a ellas mediante la síntesis y liberación de estas sustancias vasoactivas. De esta forma, la organización de la pared del vaso, donde el endotelio vascular se encuentra entre la sangre y el músculo liso, hace posible por una parte la modulación por las células endoteliales de la respuesta de contracción-relajación o de los procesos de crecimiento de la capa muscular adyacente (Figura 1), y por otra permite al endotelio interactuar con la sangre regulando la adhesión de las células sanguíneas a la pared y la agregación plaquetaria a través de las acciones vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas de factores como la PGI<sub>2</sub>, el NO o el EDHF, y las acciones vasoconstrictoras, proagregantes y proliferativas de factores como el TXA<sub>2</sub>, la PGH<sub>2</sub>, la ET-1, los radicales libres, los factores de crecimiento o las moléculas de adhesión (Furchgott y Vanhoute, 1989). Debido a estas características el endotelio tiene una función principal en la homeostasis del sistema cardiovascular y se ha empezado a considerar como el "órgano" más grande del organismo, con acciones exocrinas, paracrinas y autocrinas.



**Figura 1.-** Modulación del tono y de la estructura del músculo liso vascular por el endotelio. Las células endoteliales son sensibles a cambios en las fuerzas hemodinámicas y responden a sustancias vasoactivas circulantes y a mediadores liberados por las células sanguíneas. Estos estímulos activan la síntesis y/o liberación de los factores derivados del endotelio que modulan el tono (relajación/contracción) o el crecimiento (proliferación/antiproliferación) del músculo liso vascular, contribuyendo así a la homeostasis vascular. SP: sustancia P; VP: vasopresina; AII: Angiotensina II; AA/metabolitos: metabolitos del ácido araquidónico.

### 1.2.2.1.- Prostaciclina

La PGI<sub>2</sub> y el resto de las PGs son ácidos grasos polinsaturados que poseen en su estructura un anillo de ciclopentano. La PGI<sub>2</sub> es el primer factor relajante derivado del endotelio que fue aislado e identificado (Bunting y cols., 1976), y es el principal producto derivado del ácido araquidónico que se sintetiza en los vasos sanguíneos.

#### 1.2.2.1.1.- Biosíntesis y regulación de la Prostaciclina

La PGI<sub>2</sub> es sintetizada mayoritariamente en la capa íntima, y disminuye su síntesis

hacia la adventicia, siendo las células endoteliales sus mayores productoras. Se forma a partir del ácido araquidónico por la acción del complejo enzimático de la ciclooxigenasa (COO) y la PGI<sub>2</sub> sintetasa (Pace-Asciak, 1976). La PGI<sub>2</sub> tiene una vida media corta ya que como las demás PGs no se almacena en la célula, sino que es sintetizada y liberada por éstas en respuesta a diversos estímulos. La síntesis de PGs está regulada por diferentes factores como determinadas perturbaciones mecánicas y factores humorales. La mayoría de los agentes vasoconstrictores, como la A II, la NA, o la vasopresina, estimulan la síntesis de la PGI<sub>2</sub> (Gagnon y cols., 1974). Otros factores como la acetilcolina (Ach) o Bk también son capaces de inducir la síntesis y la liberación de la PGI<sub>2</sub>. Productos liberados por las plaquetas como la serotonina, el PDGF y la interleucina-1 (IL-1) y los nucleótidos de adenina producen asimismo la liberación de PGI<sub>2</sub> (Mitchell y cols., 1992).

*1.2.2.1.2.- Mecanismo de acción y acciones de la Prostaciclina sobre el músculo liso vascular*

La PGI<sub>2</sub> liberada por las células endoteliales actúa localmente sobre las células del músculo liso vascular y las plaquetas, produciendo la relajación vascular e inhibiendo la activación y la agregación plaquetaria respectivamente (Gryglewski, 1985). Su mecanismo de acción depende de la activación de la adenilato ciclasa y por tanto del aumento de la concentración intracelular de AMPc en las células diana (Best y cols., 1977).

La PGI<sub>2</sub> tiene una vida media corta, pero a diferencia de las otras PGs que en su mayoría son degradadas enzimáticamente al pasar por la circulación pulmonar, la PGI<sub>2</sub> escapa a esta vía metabólica y puede aparecer en la circulación general. Este hecho ha servido de base para suponer que la PGI<sub>2</sub> sería la única PGs que tendría más claros efectos vasculares a nivel sistémico (Waldman y cols., 1978). Sin embargo, los antiinflamatorios no esteroideos que inhiben también la producción de PGI<sub>2</sub>, no tienen efecto sobre la PA, lo que sugiere que la PGI<sub>2</sub> no parece estar contribuyendo de forma relevante en la regulación de ésta o en el mantenimiento del tono vascular en condiciones normales y su función sobre el tono del músculo liso parece limitarse sólo a balancear o modular la acción de otros sistemas vasoactivos. Por tanto, cabe pensar que la PGI<sub>2</sub> actuaría como un mediador paracrino y autocrino cuyas principales acciones serían su actividad fibrinolítica,

antitrombótica, antiaterogénica y citoprotectora (Gryglewski, 1985). Estos efectos relacionan a la PGI<sub>2</sub> con una función protectora del sistema cardiovascular.

La PGI<sub>2</sub> además es un potente inhibidor de la liberación de mitógenos por las plaquetas, las células endoteliales y los macrófagos, por lo que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las células del músculo liso vascular. Se ha demostrado que la PGI<sub>2</sub>, y sus análogos estables inhiben de forma directa la síntesis de ADN y la proliferación en cultivos de células de músculo liso de aorta de conejo (Morisaki y cols., 1988) y de células musculares obtenidas de placas ateroscleróticas y células musculares lisas aórticas en el hombre (Orekhov y cols., 1986; Akopov y cols., 1988).

#### 1.2.2.2.- *Tromboxano A<sub>2</sub>*

EL TXA<sub>2</sub>, como la PGI<sub>2</sub>, también es un derivado del ácido araquidónico, que se sintetiza en los vasos sanguíneos (Mehta y Roberts, 1983) pero sus acciones fisiológicas son antagónicas a las que realiza la PGI<sub>2</sub>, ya que el TXA<sub>2</sub> es un agente vasoconstrictor y proagregante plaquetario.

##### 1.2.2.2.1.- *Biosíntesis y regulación del Tromboxano A<sub>2</sub>*

El ácido araquidónico puede ser metabolizado por acción de la COO dando lugar a los endoperóxidos, intermediarios inestables muy lábiles a partir de los cuales mediante la actuación de una enzima específica como la tromboxano-sintetasa se genera el TXA<sub>2</sub>. El TXA<sub>2</sub> se forma principalmente en la media de los vasos sanguíneos (Brunkwall y cols., 1987) aunque también lo sintetizan abundantemente las células endoteliales (Ingerman-Wojenski y cols., 1981). La síntesis y liberación del TXA<sub>2</sub> en las células endoteliales también se ve incrementada por acciones mecánicas sobre el mismo endotelio o por la acción de numerosos factores. Entre ellos, la mayoría de los agentes vasoconstrictores como la NA, la vasopresina, la serotonina, la AII o la ET (Taddei y Vanhoutte, 1993; Manabe y cols., 1989) estimulan la liberación de TXA<sub>2</sub>, lo que indica que parte de las acciones de estos factores vasoconstrictores podrían ser dependientes de la liberación de TXA<sub>2</sub>. También otros agentes como la Ach, la Bk, la nicotina o el ionóforo de calcio A23187 estimulan su síntesis.



1.2.2.2.2.- *Mecanismo de acción y acciones del Tromboxano A<sub>2</sub> sobre el músculo liso vascular*

El TXA<sub>2</sub> es un potente vasoconstrictor y estimulador de la agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1978). La unión del TXA<sub>2</sub> a su receptor, que también comparte con su precursor la PGH<sub>2</sub> (Mayeux, y cols., 1988), provoca la apertura de canales de calcio en la membrana celular, creandose un flujo de calcio hacia el interior de la célula que aumenta la concentración intracelular de este ión en el músculo liso vascular y facilita el proceso de contracción. La PGH<sub>2</sub> es un endoperóxido cíclico, que también presenta acción vasoconstrictora y proagregante plaquetaria (Moncada y Vane, 1978), aunque su efecto es menos potente que el del TXA<sub>2</sub>.

Algunos estudios sugieren un importante papel para el TXA<sub>2</sub> en el control del tono vascular en determinadas situaciones fisiopatológicas. Teniendo en cuenta que la producción de TXA<sub>2</sub>, así como la de su precursor la PGH<sub>2</sub>, puede ser estimulada por la mayoría de los sistemas presores y potenciar las respuestas vasoconstrictoras de estos sistemas, un incremento de su síntesis podría participar en el desarrollo y las complicaciones vasculares y renales de algunas formas de hipertensión. Varios estudios parecen confirmar esta hipótesis, ya que existen evidencias de una incrementada producción de TXA<sub>2</sub> en los vasos sanguíneos o en los riñones de distintos modelos experimentales de hipertensión, como en la SHR (Ishimitsu y cols., 1988a,b; Konieczkowski y cols., 1983; Purkerson y cols., 1986), o en ratas con hipertensión dependiente del SRA como en la hipertensión inducida por A II (Luft y cols., 1989; Mistry y Nasjletti, 1990), en la hipertensión renovascular (Stahl y cols., 1984; Boussairi y cols., 1994) en la hipertensión por coartación aórtica (Lin y cols., 1991) o en la rata hipertensa Dahl sensible a la sal (Yamashita y cols., 1988). La inhibición de la TXA<sub>2</sub> sintetasa o el bloqueo de los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> reducen los niveles de PA y/o la vasoconstricción renal en estos modelos de hipertensión. Además algunos estudios también demuestran la participación del TXA<sub>2</sub> en el proceso aterosclerótico y se ha observado que la síntesis de TXA<sub>2</sub> podría estar aumentada en pacientes con hipercolesterolemia (Davi y cols., 1992).

El TXA<sub>2</sub>, y sus análogos estables como el U46619 estimulan la síntesis de ADN y la proliferación de las células musculares lisas de aorta en el hombre (Akopov y cols., 1988) y en la SHR (Ishimitsu y cols., 1988a,b). Además la estimulada producción de TXA<sub>2</sub> vascular en la SHR parece ser responsable en parte del incremento en la actividad proliferativa del músculo liso vascular que presenta la SHR respecto a su control normotenso la rata Wistar-Kyoto (WKY) (Ishimitsu y cols., 1988b). El tratamiento con inhibidores de la tromboxano sintetasa no sólo disminuye la PA, sino que también tienen efectos reduciendo la masa cardíaca en la SHR (Purkerson y cols., 1986). Hauss y cols. (1979) también encontraron que la aspirina inhibía la proliferación de las células del músculo liso vascular de rata y de cerdo.

### **1.2.2.3.- Oxido Nítrico**

El comienzo del descubrimiento del NO fue en 1980 cuando Furchgott y Zawadzki demostraron que era necesaria la presencia de endotelio para que se produjera la relajación inducida por la Ach en aorta aislada de conejo, puesto que la eliminación de las células endoteliales evitaba el efecto relajante de la Ach. Dado que el endotelio era esencial para la relajación y que dicha relajación no era atribuible a la acción de la PGI<sub>2</sub> porque el experimento se realizaba en presencia de inhibidores de la COO, se hipotetizó que la relajación dependiente de endotelio inducida por la Ach resultaba de la liberación de una sustancia derivada del endotelio, lábil y difusible de origen no prostanoide que se denominó "endothelium derived relaxing factor (EDRF) o factor relajante derivado del endotelio".

Poco tiempo antes de que se descubriera que la vasorrelajación producida por la Ach era dependiente de endotelio, se había demostrado que el NO causaba una relajación directa del músculo liso vascular. Además, se observó que el NO era lábil, con una vida media corta (Griffith y cols., 1984) y que su acción relajante se bloqueaba por la hemoglobina (Martin y cols., 1985), por generadores de aniones superóxido y en condiciones de hipoxia (Rubanyi y Vanhoutte, 1986). La similitud entre el EDRF y el NO hizo postular a Furchott (1988) y a Ignarro y cols. (1988) de forma independiente que el NO era un buen candidato para ser el EDRF. Sin embargo, fueron Palmer y cols. (1987 y 1988) quienes definitivamente identificaron y caracterizaron al NO como el principio activo del EDRF.

#### 1.2.2.3.1.- *Biosíntesis y regulación del Oxido Nítrico*

Palmer y cols. en 1988 demostraron en células endoteliales porcinas cultivadas que el precursor del NO era el átomo de nitrógeno situado en posición guanidino-terminal de la molécula de L-arginina. Dichos autores comprobaron también que el enantiómero de dicha molécula, la D-arginina, no actúa como sustrato para la síntesis de NO, y que análogos estructurales de la L-arginina como el N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (LNMMMA), el N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metilester (LNAME) y otros eran capaces de inhibir competitivamente su síntesis y la relajación endotelio-dependiente. La serie de reacciones que dan lugar a la síntesis de NO a partir del aminoácido L-arginina fue descrita por Marletta en 1989. Ello implica primero una hidroxilación que genera N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina y que es convertida a N<sup>G</sup>-oxo-L-arginina por la oxidación del grupo hidroxilamina. Este radical es inestable y libera NO para transformarse en una molécula estable, N-[(2-amino)-valeril]-carbodiimida. Esta molécula puede reaccionar con agua para formar L-citrulina, que puede ser transformada de nuevo en L-arginina a través de un ciclo de recuperación (Figura 2).

La biosíntesis del NO a partir de la molécula de L-arginina se lleva a cabo por la NO-sintasa (NOS), de la que se conocen actualmente tres isoformas presentes en diferentes tipos celulares: la NOSe, presente en las células endoteliales, la NOSi, presente en macrófagos y células mesangiales, aunque también aparece en células endoteliales y musculares lisas vasculares, y la NOSn presente principalmente en el tejido nervioso (Katusic y Cosentino, 1994). Las isoformas NOSe y NOSn son constitutivas mientras que la NOSi es inducible. Las formas constitutivas son dependientes de la nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), del complejo calcio-calmodulina y de la tetrahidrobiopterina y se bloquean por la acción de derivados de la L-arginina como el LNMMMA, pero no por la acción de glucocorticoides. La forma inducible también es dependiente de NADPH y de la tetrahidrobiopterina, pero no del complejo calcio-calmodulina, y se bloquea parcialmente por la acción de LNMMMA y por los glucocorticoides. El NO sintetizado por la vía constitutiva participa en procesos fisiológicos o reguladores. La NOSe es la responsable de la producción basal de NO endotelial que desempeña una función principal en el sistema cardiovascular (Romero y cols., 1992). En el cerebro la NOSn se encuentra en un grupo neuronal discreto, aunque no están claras las

vías específicas implicadas, y en las neuronas que inervan la adventicia de los vasos sanguíneos (Bredt y cols., 1990), siendo responsable de la función del NO como neurotransmisor en el SNC y periférico. El NO sintetizado por la vía inducible participa en procesos inmunes, de daño o toxicidad celular. La NOi se expresa por acción de varias citocinas como la endotoxina, el factor de necrosis tumoral (TNF) o la IL-1, y juega un importante papel en el shock endotóxico, la muerte celular y en procesos tumorales.

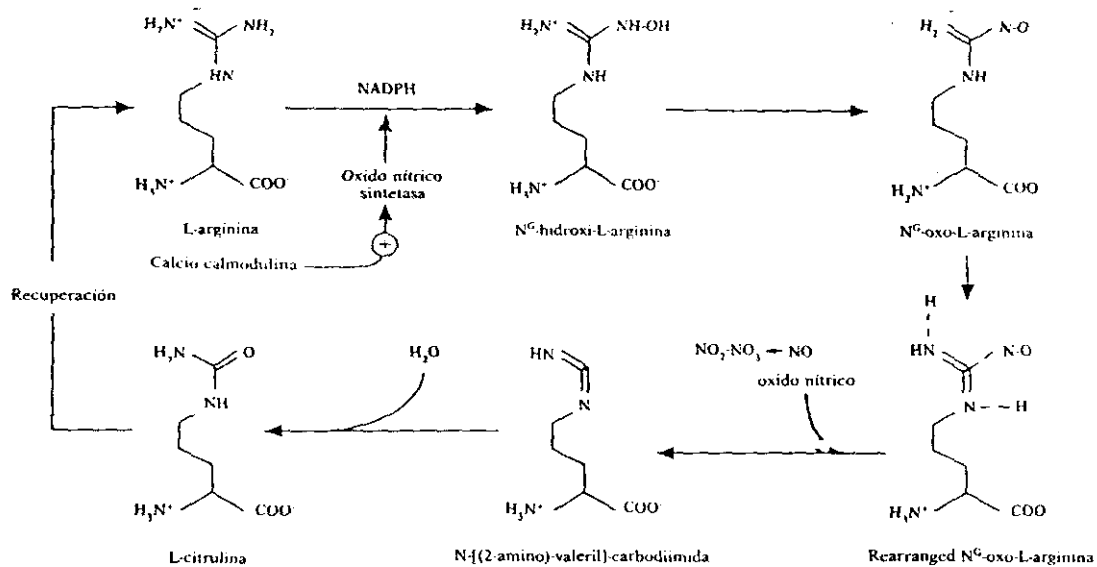


Figura 2.- Biosíntesis del NO a partir de la molécula de L-arginina

El NO se libera de las células endoteliales en respuesta a distintos factores tanto físicos (Rubanyi y cols., 1986), como de tipo humoral (Furchgott y Vanhoutte, 1989). El principal factor físico responsable de la liberación de NO por las células endoteliales son las fuerzas de cizallamiento o rozamiento producidas por la sangre sobre la superficie luminal de las células del endotelio (Rubanyi y cols., 1986). La liberación de NO producida de esta forma parece mediar la dilatación vascular causada por el aumento de flujo sanguíneo. Numerosos agentes humorales tienen la capacidad de liberar NO del endotelio vascular: Ach, Bk, catecolaminas, AII, ET-1, vasopresina, trombina, serotonina, sustancia P, ácido

araquidónico, histamina, ionóforos de calcio, nucleótidos de adenina, el factor activador de las plaquetas (PAF), ect (Furchgott y Vanhoutte, 1989). Se ha sugerido que el NO actúa como mediador local de los denominados vasodilatadores dependientes de endotelio, como la Ach y la Bk, o como el mediador de la acción vasodilatadora local que se produce en el proceso inflamatorio en respuesta a sustancias como el ácido araquidónico, la Bk o la histamina (Moncada y cols., 1991). La liberación de NO en respuesta a ciertas hormonas vasoconstrictoras como la AII, la vasopresina y las catecolaminas sería responsable de la vasodilatación inducida por estos factores sobre territorios vasculares específicos, y modularía su acción constrictora. Además debido a la acción antiagregante del NO los productos derivados de los procesos de coagulación y de agregación plaquetaria como el adenosín difosfato (ADP), la trombina, la serotonina y el PAF, estimulan la liberación de NO, lo que explica porque la presencia de endotelio vascular supone una protección contra la agregación plaquetaria y la formación de trombos (Cohen y cols., 1983).

#### *1.2.2.3.2.- Mecanismo de acción y acciones del Oxido Nítrico sobre el músculo liso vascular*

Murad y cols. (1979) demostraron que existía una correlación entre los niveles de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) en el músculo liso vascular y la relajación de éste, sugiriendo que el proceso de vasorrelajación estaba ligado de alguna forma a modificaciones del contenido intracelular de este mediador. Posteriormente se descubrió que los nitrovasodilatadores como la nitroglicerina, el nitroprusiato sódico (NPS) y otros nitratos orgánicos producían un aumento de GMPc en las células del músculo liso vascular (Ignarro y cols., 1981), indicando que la acción vasodilatadora de dichos fármacos estaba mediada por el GMPc a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble. Los nitroderivados reaccionan con tioles, como la cisteína y el glutathion, dando lugar a intermediarios inestables, S-nitroso tioles, que se descomponen espontáneamente generando NO, por lo que estos fármacos se consideran como donadores exógenos de NO. El NO así generado es el que va activar la guanilato ciclasa soluble incrementando los niveles de GMPc e iniciando el proceso de relajación. Así mismo, se demostró que existía una correlación entre el incremento del GMPc y el grado de relajación dependiente de endotelio producida por la Ach (Ignarro y cols., 1984) y otros agentes que inducen la liberación de NO, sugiriendo

también la mediación de este mensajero intracelular en el proceso de relajación dependiente de endotelio. El NO sintetizado en la célula endotelial se difunde unido a una molécula transportadora, probablemente como un S-nitroso derivado, a través del músculo liso vascular subyacente, donde se libera y se fija al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble estimulando la liberación de GMPc en el citoplasma de las células diana (Craven y de Rubertis, 1978; Rubanyi y cols., 1989). El proceso de relajación dependiente de GMPc no es del todo conocido, pero entre los mecanismos implicados podría intervenir la modulación de las proteínas cinasas, la defosforilación de unidad reguladora de la cadena ligera de la miosina y el control de la homeostasis del calcio intracelular que conduciría a una disminución del calcio citosólico y al proceso de relajación (Rapoport y cols. 1983).

El NO es un factor de acción paracrina cuyas acciones principales además de la relajación del músculo liso vascular, son la inhibición de la agregación y de la adhesión plaquetaria (Radomski y cols., 1987a y b) y la inhibición del crecimiento del músculo liso vascular (Dubey y Overbeck, 1994). Además, el NO va a participar de forma decisiva en la regulación del tono vascular, de la PA y de la función renal (Romero y cols., 1992).

El NO liberado basalmente por las células endoteliales, ejerce una acción tónica relajante sobre el músculo liso vascular que va a mantener un cierto tono de vasorrelajación necesario para preservar el flujo sanguíneo local. Por tanto el NO tiene un papel preponderante en el mantenimiento del tono basal del sistema cardiovascular. Esta importante acción del NO se demuestra utilizando inhibidores competitivos de su síntesis, como el LNMMA o el LNAME (Tolins y cols., 1990; Rees y cols., 1989). La infusión intravenosa de estos inhibidores a animales de experimentación produce una elevación dosis dependiente de la PA, que se revierte con el precursor de la síntesis de NO, la L-arginina; lo que indica que la liberación continua del NO contribuye en gran medida a la regulación de las resistencias vasculares periféricas y por tanto de la PA. Este importante papel del NO en la regulación de la PA ha llevado a proponer que las alteraciones en la liberación de este factor endotelial podrían participar en el desarrollo de la hipertensión. Este aspecto está apoyado por diversos estudios en individuos normotensos en los que la infusión de LNMMA en la arteria braquial aumenta la resistencia vascular, disminuye el flujo sanguíneo y atenúa los efectos vasodilatadores de la Ach (Vallance y cols., 1989). Asimismo, el NO también

participa decisivamente en la regulación de la circulación renal, de la tasa de filtración glomerular y en la excreción urinaria de sodio. La modulación de estas funciones, también contribuye al control de la PA (Romero y cols., 1992).

El NO juega un papel importante en la regulación del crecimiento y de la migración de las células musculares lisas, siendo el principal agente antiproliferativo que puede antagonizar las acciones proliferativas tanto de los factores derivados del endotelio como de aquellos con acción sistémica. El NO es capaz de inhibir la proliferación y mitogénesis de las células del músculo liso mediante una elevación de los niveles de GMPc (Dubey y Overbeck, 1994). Por tanto, los vasodilatadores como el NPS y otros compuestos dadores exógeno de NO, son capaces de inhibir la síntesis de ADN y el crecimiento de las células musculares lisas aórticas de rata y conejo (Gard y Hassid, 1989 ; Kariya y cols., 1989). En carótidas de rata dañadas mediante un catéter, la administración de L-arginina produce un aumento local de la formación de NO, e inhibe la proliferación y la migración de las células del músculo liso (Taguchi y cols., 1993). Además varios factores de crecimiento que inducen la proliferación de las células musculares lisas aórticas de conejo pueden estimular la liberación de NO que modularía sus acciones (Scott-Burden y cols., 1992). También se ha demostrado que la heparina, un potente inhibidor del crecimiento de las células del músculo liso vascular producido por el endotelio, estimula la liberación de NO de las células endoteliales (Yokakawa y cols., 1993) inhibiendo el crecimiento de las células musculares lisas. Así pues, el efecto antiproliferativo del NO podría prevenir la hipertrofia y la hiperplasia del músculo liso que tiene lugar en el envejecimiento o en la hipertensión, así como la formación de la neointima post-angioplastia.

Debido a estas acciones el NO tiene una función principal en el mantenimiento de la estructura e integridad vascular, a la que también contribuye su efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria a través del incremento de los niveles de GMPc (Cohen y cols., 1983). De esta forma, el NO junto con la PGI<sub>2</sub> participa en el mantenimiento de la permeabilidad vascular. Los defectos en la producción de NO pueden contribuir, por tanto, no sólo a la patogénesis de estados hipertensivos, sino también favoreciendo la trombosis vascular, la aterogénesis, la reestenosis y el daño post-angioplastia.

#### 1.2.2.4.- *Endotelina*

En 1985 se tiene la primera noción sobre la existencia de una actividad peptidérgica vasoconstrictora derivada del endotelio (Hickey y cols., 1985). Más tarde, en 1988 Yanagisawa y cols. (1988) aislan del sobrenadante de células endoteliales de aorta de cerdo un péptido de 21 aminoácidos con potente acción vasoconstrictora a la que denominan ET. Actualmente la ET es considerada como la sustancia endógena con mayor capacidad vasoconstrictora. Se han descrito tres isopéptidos distintos denominados como ET-1, ET-2, ET-3 que aunque se diferencian en algunos aminoácidos (Enggürd y cols., 1990), presentan la misma secuencia en el hexapéptido C-terminal. Los tres tienen actividad biológica pero difieren en su potencia farmacológica. El primero corresponde al péptido hallado inicialmente, siendo la forma predominante en las células endoteliales, aunque parece ser la ET-2 la de mayor potencia vasoconstrictora, mientras que la ET-3 presenta la menor potencia de las tres (Enggürd y cols., 1990).

##### 1.2.2.4.1.- *Biosíntesis y regulación de la Endotelina*

La ET no sólo se produce en células endoteliales, sino que también se encuentra en las células del músculo liso, células mesangiales, células nerviosas, melanocitos, células paratiroides y células amnióticas. Al igual que ocurre con otros péptidos, las células endoteliales vasculares sólo sintetizan ET-1 en forma de pre-pro-endotelina, que es una molécula precursora de 212 aminoácidos en la preproET-1 humana. La producción del péptido activo implica la escisión de la preproET-1 para generar un péptido intermediario de 38 ó 39 aminoácidos, denominado big-ET-1. La big-ET-1 sintetizada en las células endoteliales parece ser sustrato para una endopeptidasa, la enzima convertidora de ET, que da lugar a la forma activa de 21 aminoácidos (Enggürd y cols., 1990). El candidato más probable para la enzima convertidora de ET es una metalo-proteasa. Esta conversión a la forma madura es necesaria para el desarrollo de su actividad vascular total (Kimura y cols., 1989). La biosíntesis de ET está regulada a nivel de la transcripción del ARN mensajero (ARNm) y puede ser inducida por diversos estímulos de naturaleza química, mecánica o humoral (Kon y Badr, 1991), como la endotoxina, la trombina, ionóforos de calcio, vasoconstrictores como la NA, la AII o la vasopresina, factores de crecimiento como el



TGF $\beta$ , activadores de la proteína quinasa C como los esteres de forbol, el TNF, la IL-1 y la insulina. Asimismo, las fuerzas de cizallamiento de la sangre y el estres por rozamiento mecánico o las condiciones de hipoxia estimulan la síntesis de ET en las células endoteliales.

#### 1.2.2.4.2.- *Mecanismo de acción y acciones de la Endotelina sobre el músculo liso vascular*

La ET ejerce su efecto vasoconstrictor actuando directa y específicamente sobre las células del músculo liso vascular y su mecanismo de acción está mediado por una modificación de la homeostasia celular del calcio. La ET produce un aumento de la concentración de calcio citosólico debido a la activación del sistema de los fosfoinositoles y la liberación del calcio de los depósitos intracelulares, así como por un aumento de la entrada de calcio extracelular (Miasiro y cols.,1988), que conducen al proceso de contracción. La ET va a interaccionar con receptores específicos, a través de los cuales ejerce sus acciones biológicas. Se han descrito dos tipos de receptores implicados en la respuesta inducida por la ET: ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, que se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, el pulmón, el riñón, las glándulas adrenales, el bazo y el intestino (Sakurai y cols., 1992). La respuesta farmacológica inducida por la ET es de dos tipos, una conduce a la vasoconstricción y la proliferación vascular para la que las isoformas ET-1 y ET-2 actuarían como potentes agonistas, mientras que la otra produce vasodilatación transitoria y donde las tres formas tendrían la misma potencia. Estas dos diferentes respuestas producidas por la ET parecen relacionarse con los dos subtipos de receptores encontrados. El receptor ET<sub>A</sub> presente en las células del músculo liso vascular, tiene una alta afinidad para la ET-1 y la ET-2, pero poca afinidad frente a la ET-3, y mediaría la respuesta contráctil de la ET-1. El subtipo ET<sub>B</sub> tiene una afinidad semejante por los tres isopéptidos y se encuentra principalmente en las células endoteliales (aunque también se pueden encontrar en las células musculares lisas) donde induce la estimulación de la síntesis de NO y de PGI<sub>2</sub>, produciendo por tanto relajación que podría así modular su acción vasoconstrictora (Masaki, 1995; Sakurai y cols., 1992).

La ET, de forma similar al NO, actúa como una sustancia de acción paracrina más que como una hormona circulante. Además de producir la contracción del músculo liso

vascular, la ET puede modular los reflejos cardiovasculares, la actividad de centros nerviosos vasomotores y la función renal, así como influir sobre la liberación de la renina, la aldosterona, la vasopresina o las catecolaminas (Rubanyi, 1995). La ET además tiene acciones mitogénicas en diversos tipos de células (Komuro y cols., 1988).

La acción principal de la ET-1 es producir una potente y prolongada contracción del tejido vascular (Yanagisawa y cols., 1988; Hirata y cols., 1988). Su acción no sólo es más efectiva, sino que también es mucho más duradera que las contracciones inducidas por otros agentes presores hasta ahora caracterizados. La respuesta sistémica a una infusión de ET-1 es bifásica, produciendo primero una hipotensión transitoria debida probablemente a la liberación de NO a través de los receptores ET<sub>B</sub>, y después una respuesta presora mantenida que es el efecto predominante. En el hombre y en animales de experimentación, la ET-1 eleva la PA mediante un marcado incremento de las resistencias vasculares periféricas, aunque el gasto cardíaco permanece inalterado o incluso disminuye a dosis elevadas. Las acciones directas de la ET-1 sobre el corazón incluyen efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos así como una prolongación de la duración del potencial de acción. La ET también afecta indirectamente a la función cardíaca a través de una vasoconstricción coronaria marcada que reduce el flujo coronario (Rubanyi, 1995).

A pesar de ser el vasoconstrictor más potente que se conoce, la ET no parece tener un papel regulador muy importante en todo el torrente vascular, como ocurriría con el NO, aunque la producción local de ET sí podría contribuir a regular el tono vascular regional. Además los niveles circulantes de ET en individuos normales son demasiado bajos, del orden de 1 pg/ml, para poder contribuir a sus efectos farmacológicos, por lo que la ET parece actuar como un factor regulador local. Probablemente los efectos vasoconstrictores de la ET se producen tras su liberación en la zona abluminal, próxima al músculo liso, donde debe encontrarse en mayor concentración que en la circulación. Sin embargo, la ET podría contribuir en el desarrollo o en las complicaciones de distintas patologías donde sus niveles circulantes se encuentran elevados, como es el caso de la hipertensión, la insuficiencia renal aguda, la angina de pecho, la insuficiencia cardíaca congestiva o el infarto de miocardio (Rubanyi y Parkes-Botelho, 1991). También se ha demostrado la participación de la ET-1 en el proceso aterosclerótico (Bacon y cols., 1996).

La ET estimula el crecimiento y la proliferación en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo las células del músculo liso vascular, las células endoteliales, los fibroblastos, las células gliales y las células mesangiales. Esta propiedad sugiere un posible papel de la ET en los procesos patológicos de crecimiento cardiovascular y renal como la hipertrofia vascular, la hipertrofia ventricular o las alteraciones glomerulares proliferativas, y también ha sido implicada en la formación de la neointima postangioplastia (Azuma y cols., 1994). Sus efectos proliferativos sobre las células del músculo liso vascular parecen estar mediados a través del incremento en la expresión de varios protooncogenes como el c-myc, el c-fos, y el c-jun (Komuro y cols., 1988). Aunque la ET-1 por si misma es débilmente mitogénica, en combinación con otros factores de crecimiento como el PDGF o el bFGF se potencia su acción. Además, la ET-1 puede estimular la proliferación del músculo liso y la hipertrofia de los cardiomiocitos indirectamente facilitando la producción local de otro potente mitógeno, la AII (Ito y cols., 1993; Ishiye y cols., 1995). Es pues posible que a través de estas acciones la ET-1 no sólo participe en la patogénesis de ciertas enfermedades cardiovasculares, sino que también puede contribuir en la regulación del crecimiento vascular.

#### **1.2.2.5.- Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio**

Además del NO y la PGI<sub>2</sub>, el endotelio puede liberar un factor(es) no identificado todavía que induce la relajación vascular al producir la hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso y que se ha denominado como EDHF (Feletou y Vanhoutte, 1988). La relajación dependiente de endotelio, por tanto, no puede ser atribuible sólomente a la liberación de NO y/o PGI<sub>2</sub>, sino que también el EDHF puede contribuir a ésta. Así, en los vasos sanguíneos de varias especies animales estas hiperpolarizaciones son resistentes a los inhibidores de la NOS y de la COO (Corriu y cols., 1996; Murphy y Brayden, 1995). Además a diferencia del NO que produce una relajación mantenida del músculo liso vascular, la relajación que produce el EDHF es transitoria. La hiperpolarización inducida por el EDHF parece ser debida a un incremento en la conductancia al K<sup>+</sup> en la membrana del músculo liso vascular, ya que el EDHF liberado por las células endoteliales va a activar determinados canales de K<sup>+</sup> en las células musculares lisas. El NO o la PGI<sub>2</sub> también pueden producir hiperpolarización en algunos vasos sanguíneos pero esta respuesta es bloqueada por

la glibenclamida (Corriu y cols., 1996; Murphy y Brayden, 1995), sugiriendo la implicación de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP en este efecto. Sin embargo, la hiperpolarización inducida por el EDHF es insensible a la glibenclamida pero dependiendo del tejido es inhibida por tetraetilamonio (TEA) (Kamata y cols., 1995), apamina (Murphy y Brayden, 1995) o la combinación de apamina y caribdotoxina (Corriu y cols., 1996), indicando que serían los canales de  $K^+$  dependientes de calcio probablemente los que estarían implicados en su respuesta.

La naturaleza del EDHF es desconocida actualmente, aunque se ha sugerido que podría tratarse de un metabolito lábil derivado del ácido araquidónico a través de la vía del citocromo  $P_{450}$  (Cohen y Vanhoutte, 1995). Los productos de la vía del citocromo  $P_{450}$ , y principalmente los ácidos epoxyecosatrienoicos, liberados por las células endoteliales estimulan los canales de  $K^+$  activados por calcio sensibles a TEA o caribdotoxina e inducen la hiperpolarización de las células del músculo liso arterial, por lo que podrían ser buenos candidatos para ser el EDHF. Sin embargo, en los vasos sanguíneos de algunas especies los inhibidores del citocromo  $P_{450}$  no afectan a las hiperpolarizaciones dependientes de endotelio, indicando que el EDHF no está todavía identificado con certeza. Tampoco se conoce muy bien el papel fisiológico del EDHF en la regulación del tono vascular, aunque se sabe que se libera *in vitro* por acción de concentraciones elevadas de Ach o de Bk (Mombouli y cols., 1992; Fujii y cols., 1992), por lo que cabe suponer que media, al menos parcialmente, la acción vasodilatadora de estos agentes. En este sentido se ha descrito que el EDHF contribuye de forma importante en la relajación dependiente de endotelio inducida por la Bk en un gran número de vasos sanguíneos (Mombouli y cols., 1992). Asimismo, se ha observado la liberación de EDHF estimulado por agentes vasoconstrictores como la ET-3, lo que podría modular su acción constrictora (Nakashima y Vanhoutte., 1993). Fisiológicamente el componente EDHF de la relajación dependiente de endotelio es proporcionalmente más importante en las pequeñas arterias que en los grandes vasos. También el EDHF podría tener cierta importancia en algunas situaciones fisiopatológicas, ya que se ha demostrado que durante el envejecimiento, así como en la hipertensión las hiperpolarizaciones dependientes de endotelio inducidas por la Ach en arterias mesentéricas de rata están disminuidas (Fujii y cols., 1992; Fujii y cols., 1993).

### 1.2.2.6.- Factores Constrictores Derivados del Endotelio

El endotelio vascular frente a determinados estímulos también libera factores vasoconstrictores de naturaleza diversa que se han denominado en conjunto como EDCFs (Katusic y cols., 1987; Rubanyi y Vanhoutte., 1985). La naturaleza exacta de estos factores vasoconstrictores endoteliales actualmente no se conoce por completo, aunque varios estudios han sugerido que se trata principalmente de productos derivados de la cascada del ácido araquidónico como el  $\text{TXA}_2$  o la  $\text{PGH}_2$  y/o de radicales libres de oxígeno, y también la ET ha sido identificada como uno de ellos.

La respuesta contráctil dependiente de endotelio producida por la hipoxia parece ser consecuencia de un aumento de los radicales libres, tanto de aniones superóxido como hidroxilo, que no parecen actuar directamente sino a través de la oxidación del NO, lo que conduce a su inactivación produciendo una reducción del tono vasodilatador basal (Rubanyi y Vanhoutte, 1986; Rubanyi, 1988). La vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por aumentos de la presión transmural se bloquea con inhibidores de la COO, lo que sugiere que un metabolito prostanoide del ácido araquidónico mediaría dicho efecto (Lüscher y cols., 1990). La contracción dependiente de endotelio que produce la Ach cuando se encuentra inhibida la síntesis de NO en vasos aislados también se bloquea con inhibidores de la COO y con antagonistas de los receptores de  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$  (Küng y Lüscher, 1995; Auch-Schwelk y cols., 1992). Así, endoperóxidos como el  $\text{TXA}_2$  (Altiere y cols., 1985) o el endoperóxido cíclico  $\text{PGH}_2$  (Kato y cols., 1990) que comparten el mismo receptor parecen ser los candidatos más probables. Aunque no se conoce totalmente la significación cardiovascular de estos factores, se sabe que la liberación de los EDCFs puede ser estimulada por distintos agentes vasoconstrictores como la propia ET, la serotonina, la NA y la AII (Taddei y Vanhoutte., 1993; Auch-Schwelk y Vanhoutte, 1991; Manabe y cols., 1989) y por tanto podrían mediar sus acciones vasculares. Además, como se ha mencionado la Ach y también otros factores vasodilatadores estimulan su síntesis y liberación, por lo que los EDCFs han sido implicados en la reducción de la relajación dependiente de endotelio, así como en el incremento de las contracciones dependientes de endotelio en distintas situaciones como la hipertensión o el envejecimiento (Diederich y cols., 1990; Koga y cols., 1988; Koga y cols., 1989).

## **2.- FISILOGIA DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

### **2.1.- DESCRIPCION DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

El SRA es el principal sistema hormonal que regula el tono vascular y el equilibrio hidroelectrolítico. La cascada del SRA se inicia con la renina, enzima proteolítica que procede de la preprorenina. La transformación de prorenina en renina tiene lugar mediante la acción de diversas peptidasas como la plasmina, la tonina, la calicreína, la elastasa, el activador del plasminógeno tisular, la catepsina G y la enzima activadora de la renina derivada del endotelio. La renina actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, una  $\alpha_2$ -globulina de origen hepático, generando un decapeptido inactivo, la AI. A su vez la AI es el sustrato de la ECA para dar lugar al octapéptido AII, que es fundamentalmente el factor biológicamente activo del sistema y su principal efector. La AII por acción de la aminopeptidasa A origina la angiotensina III (AIII) o angiotensina 2-8, con acciones similares a la AII aunque de menor intensidad. Asimismo, la acción de la aminopeptidasa B sobre la AII da lugar a la angiotensina IV (AIV), cuya significación fisiológica todavía no se conoce bien. Mediante la acción de una endopeptidasa sobre la AI o sobre la AII se genera la angiotensina 1-7 (A(1-7)) cuyas acciones parecen ser opuestas a las que presenta la AII (Moriguchi y cols., 1995). La A(1-7) tiene un efecto natriurético y diurético en el riñón (Dellipizzi y cols., 1994; Hilchey y Bell-Quilley, 1995; Handa y cols., 1996) y produce vasodilatación en diferentes territorios vasculares (Osei y cols., 1993; Porsti y cols., 1994; Brosnihan y cols., 1996). Estas acciones de la A(1-7) parecen ser dependientes de las PGs, del NO y/o de las cininas (Hilchey y Bell-Quilley, 1995; Brosnihan y cols., 1996; Abbas y cols., 1997) (Figura 3).

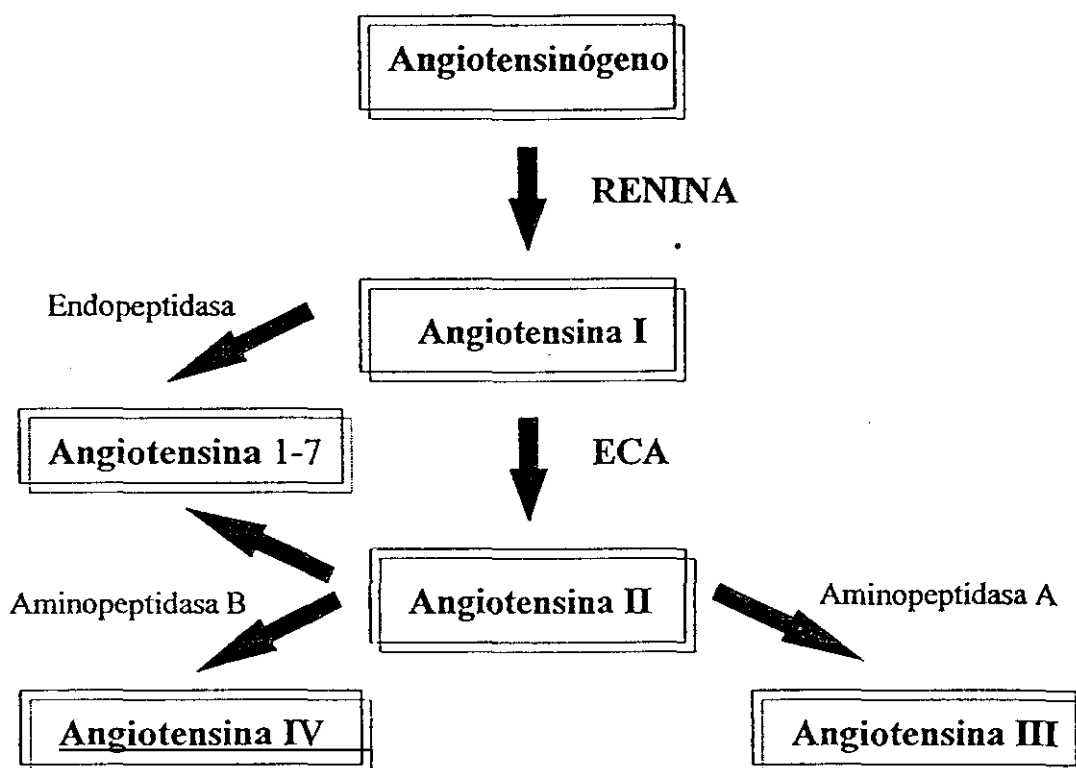


Figura 3.- Componentes del sistema renina-angiotensina

### 2.1.1.- Vías de síntesis de A II distintas del Sistema Renina-Angiotensina

Además de esta vía enzimática del SRA parece que la formación AII también puede tener lugar a través de otras rutas. En la actualidad se ha descrito la existencia de distintas vías enzimáticas de síntesis de la AII en numerosos tejidos (Dzau y cols., 1993) (Figura 4). Algunas de estas vías enzimáticas tienen la capacidad de generar AII directamente a partir del angiotensinógeno, como la catepsina G, la tonina y el t-PA. También se han detectado peptidasas en la pared de los vasos sanguíneos, diferentes de la renina, que pueden actuar sobre el angiotensinógeno y formar AI. Asimismo, se ha descrito que la ECA, no es la única enzima capaz de formar AII, ya que otras enzimas como la catepsina G, la quimasa y la enzima generadora de AII "quimostatin-sensible" ó CAGE pueden sintetizar AII a partir de AI. Se ha demostrado que en numerosos vasos sanguíneos existe esta conversión de AI en

AII independiente de la ECA en mayor o menor proporción (Nakamaru y cols., 1987; Cornish y cols., 1979; Okunishi y cols., 1984). Okunishi y cols. en 1987 observaron que la ECA se encontraba predominantemente en el endotelio de los vasos, mientras que la actividad formadora de AII independiente de la ECA se encontraba fundamentalmente en la adventicia (Okunishi y cols., 1987). Este autor sugirió que la responsable de la formación de AII en la adventicia de los vasos sanguíneos en perros sería una enzima formadora de AII parecida a la quimiotripsina. Al estudiar las vías metabólicas de síntesis de AII en el corazón humano, se observó también que más del 75% de la actividad enzimática formadora de AII en preparaciones tisulares homogenizadas de ventrículo izquierdo no era bloqueada por inhibidores de la ECA (IECAs), sino por un inhibidor de proteasas séricas, la quimostatina y por la tripsina de soja (Urata y cols., 1990a). Estudios posteriores demostraron que la principal proteasa sérica formadora de AII derivada de los ventrículos humanos era la quimasa (Urata y cols., 1990b) y que el sistema quimasa-angiotensina podría regular los niveles de AII en algunos compartimientos celulares del corazón y los vasos sanguíneos. Por tanto, aunque la relevancia fisiológica o fisiopatológica de estas otras vías de síntesis de AII permanece todavía por esclarecer, se ha propuesto que la vía de la quimasa en el corazón y en la pared vascular podría tener importancia tanto en el aspecto funcional como en las alteraciones estructurales que la AII produce en estos órganos (Husain, 1993).

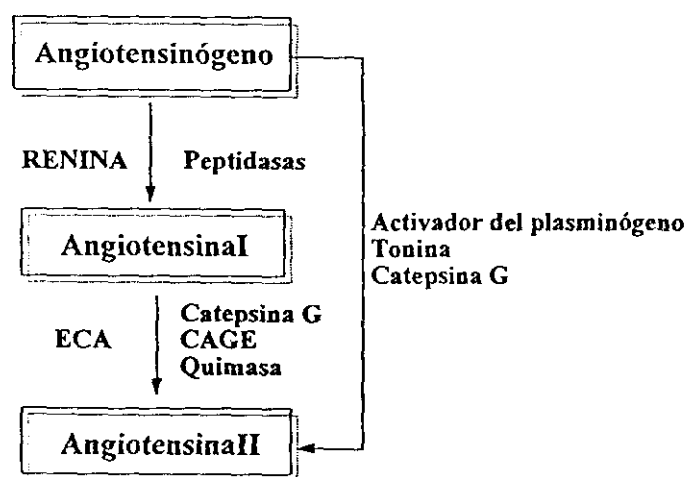


Figura 4.-Vías de síntesis de angiotensina I y II



### 2.1.2.- Sistemas Renina-Angiotensina circulante y tisulares

Tradicionalmente se ha considerado la existencia de un SRA circulante (Laragh y cols., 1972), sin embargo no es el único SRA existente en el organismo, ya que se ha detectado la presencia de todos los componentes del SRA y de sus ARNm en diferentes tejidos como el cerebro, las glándulas adrenales, los órganos reproductores, el corazón y especialmente en los vasos sanguíneos (Samani y cols., 1988; Rosenthal y cols., 1984). Aunque la mayor parte de la AI plasmática está producida por la renina circulante procedente del riñón, existe la creencia generalizada de que la renina tisular desempeña un papel importante en la formación local de AI. Varios estudios demuestran que la renina vascular es sintetizada *in situ* en células del músculo liso vascular (Re y cols., 1982) y células endoteliales cultivadas (Lilly y cols., 1985). También algunos trabajos que muestran la conversión vascular de AI exógena en AII (Egleme y cols., 1990), así como estudios en tejidos aislados (Nakamaru y cols., 1987) y en células cultivadas (Kifor y Dzau., 1987) donde se observa una liberación espontánea de AI en la media arterial, sugieren que la AII tisular puede derivarse tanto de la AI formada a nivel local como de la extraída del plasma. De esta forma tanto el angiotensinógeno como la AI, la AII y la AIII vascular, pueden ser medidos intracelularmente. Esta AII liberada por las células vasculares, podría tener una importante influencia sobre la función y la estructura de los vasos sanguíneos, afectando al tono y al crecimiento vascular. Se ha pensado que estos procesos intracelulares que pueden ser operativos en muchos tipos distintos de células que liberan AII podrían servir como un mecanismo regulador o amplificador de la función local (Dzau, 1984). Por tanto, se ha propuesto que el SRA circulante tendría una acción fundamentalmente endocrina, mientras que los SRA tisulares tendrían acciones auto y paracrinas. Aunque este esquema es aceptado actualmente, cada vez parece más difícil establecer una frontera clara entre el SRA circulante y los tisulares. Ello es debido a que algunos componentes circulantes como el angiotensinógeno o la renina podrían ser captados por los tejidos y participar en la producción tisular de AII; asimismo, la AII producida localmente podría pasar a la circulación y formar parte del SRA circulante. Como consecuencia de esto, la visión más actual propugna la existencia de un SRA que englobaría al circulante y a los tisulares y que realizaría tanto funciones endocrinas como paracrinas, autocrinas e intracrinas.

La relevancia de los SRA tisulares no está muy clara, pero se ha sugerido su participación en algunas patologías como la hipertensión esencial en el hombre, la hipertensión renovascular o en la SHR (Okamura y cols., 1986; Asaad y Antonaccio, 1982; Rowland y cols., 1995). Así, se podría postular que una anormal actividad del SRA tisular que conduciría al incremento de la producción y de las acciones de la AII local en los vasos sanguíneos, el corazón, el riñón o el SNC, órganos que están implicados directamente en la regulación de la PA, podría contribuir al desarrollo y/o al mantenimiento de la hipertensión.

## 2.2.- RENINA

### 2.1.1.- Síntesis

La renina es una aspartil proteasa de 38 Kd que presenta una alta especificidad, siendo el angiotensinógeno su único sustrato conocido *in vivo*. El gen de la renina se expresa en un gran número de especies y de tejidos, principalmente en el riñón, pero también en el cerebro, las glándulas adrenales, el corazón, el útero, los testículos etc. (Samani y cols., 1988). Sin embargo, aunque se ha detectado la presencia de renina en numerosos tejidos extrarrenales, parece que el riñón es la principal fuente de producción de renina plasmática, ya que la nefrectomía bilateral en animales de experimentación consigue que sus niveles plasmáticos desaparezcan casi completamente. La síntesis de la renina comienza con la formación de una larga molécula de 45 kd denominada preprorenina, que da lugar a otra de menor tamaño, la prorenina. En las células yuxtglomerulares del riñón humano, la prorenina sigue una vía de secreción constitutiva o bien es almacenada en gránulos inmaduros. Dentro de éstos sufre otras dos fragmentaciones más para dar la renina activa, formada por una sola cadena polipeptídica glicosilada de 340 aminoácidos, que queda almacenada en gránulos maduros. La renina se libera de las células yuxtglomerulares junto con la prorenina pasando a la circulación sistémica.

El aparato yuxtglomerular del riñón representa el principal componente estructural del SRA. Es una estructura compleja que relaciona el polo vascular de los glomerulos renales (parte distal de la arteriola aferente, parte proximal de la eferente y la región

mesangial extraglomerular) con una porción diferenciada del túbulo distal de la nefrona. Este conjunto de elementos vasculares y tubulares está constituido por distintos tipos de células: las células yuxtaglomerulares, son las células mioepiteliales productoras de renina y están localizadas principalmente en la túnica media de la arteriola aferente; las células de la región mesangial extraglomerular, denominadas clásicamente como células del Lacis, son células no muy bien diferenciadas ubicadas entre la arteriola aferente y la eferente y en contacto directo con la mácula densa, aunque no se conoce todavía bien la función que desempeñan posiblemente puedan servir de unión funcional entre la mácula densa, las arteriolas y el mesangio, ya que presentan uniones celulares con todos estos elementos; el componente tubular del aparato yuxtaglomerular está representado por la mácula densa. Esta es una agrupación de células epiteliales especializadas diferenciadas a partir de una sección del túbulo contorneado distal que se encuentra en estrecho contacto con la arteriola aferente y eferente. Debido a esta idónea localización la mácula densa juega un papel regulador importante en la secreción de la renina.

### **2.2.2.- Regulación**

La regulación de la síntesis y liberación de la renina es un factor decisivo para la formación de AI y por tanto de AII, ya que la cantidad de angiotensinógeno disponible, que es sintetizado por el hígado, es prácticamente constante y la reacción renina-angiotensinógeno depende casi exclusivamente de la tasa de secreción de la enzima. Por ello, el control de la secreción de la renina, a través de diferentes mecanismos que se describen a continuación, junto con el de ECA, es el principal punto de regulación del SRA.

#### **2.2.2.1.- Mecanismo de la mácula densa**

La estrecha asociación anatómica que se observa entre la mácula densa y las células yuxtaglomerulares hizo pensar en la existencia de una relación funcional entre ambos tipos de células. Las células de la mácula densa detectan las variaciones de flujo o de la concentración de solutos en el túbulo distal, modificando consecuentemente la liberación de renina por parte de las células yuxtaglomerulares. Vander propuso en 1967 que la secreción de renina aumenta cuando disminuye la concentración tubular de  $\text{ClNa}$  y viceversa,

indicando que la secreción de renina varía inversamente al contenido tubular de ClNa.

#### ***2.2.2.2.- Mecanismo barorreceptor-presión de perfusión renal***

Los primeros estudios que permitieron establecer una relación entre la presión de perfusión renal y la secreción de renina fueron realizados por Goldblatt en 1934. Sin embargo, fueron Tobian y cols. en 1959 quienes formularon por primera vez la existencia de un mecanismo barorreceptor implicado en la secreción de renina, describiendo una relación inversa entre ambos parámetros, al demostrar que un aumento de la PA y de la presión de perfusión renal producía una disminución del número y contenido de gránulos de renina en las células yuxtaglomerulares. Así, las mismas células yuxtaglomerulares se comportarían como un barorreceptor sensible a las modificaciones de la presión intravascular o de la tensión transmural de la pared de la arteriola aferente, traduciendo estas modificaciones en cambios en la secreción de renina.

Las variaciones de la presión de perfusión renal también pueden alterar la tasa de filtración glomerular (TFG) y la cantidad de ClNa que llega al túbulo distal, afectando a las células de la mácula densa. Por esta razón el efecto de los cambios de la presión de perfusión renal sobre la secreción de renina podría también implicar la regulación dependiente de la mácula densa. En condiciones fisiológicas, por tanto, es posible que ambos mecanismos estén actuando conjuntamente, sumando sus efectos para inhibir o estimular la secreción de renina (Sealey y Laragh, 1990).

#### ***2.2.2.3.- Sistema nervioso simpático***

El SNS juega un importante papel regulando la secreción de renina en situaciones que requieren una respuesta inmediata como el ejercicio, el cambio postural o la pérdida de volumen. Se ha observado que la innervación de las células yuxtaglomerulares es predominantemente simpática (Barajas, 1979), y en general, un incremento de esta actividad determina un aumento en la liberación de renina (Vander, 1965). El aumento de la secreción de renina producido por la estimulación nerviosa simpática, o mediado por la NA se bloquea con antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo que sugiere que este tipo de receptores

estarían implicados en dicha acción. La presencia de estos receptores en las células yuxtaglomerulares, junto con la observación de que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos estimulan la liberación de renina tanto *in vivo* como *in vitro*, parecen confirmar este hecho (Desaulles y cols., 1978).

El papel de la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica en el control de la secreción de renina no está totalmente esclarecido, aunque la mayoría de los estudios realizados hasta el momento apuntan hacia un efecto inhibitor sobre su secreción. Hay que señalar además, que mientras la estimulación de la liberación de renina mediada por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se da en situaciones de un incremento moderado del tono simpático, la inhibición de la secreción de renina vía receptores  $\alpha$ -adrenérgicos sólo ocurre a altas intensidades de estimulación nerviosa que pueden afectar también a la hemodinámica y la función excretora renal. Por ello, sabiendo que tanto las alteraciones de la hemodinámica renal como de la función tubular, pueden influir sobre la liberación de renina, se hace difícil distinguir si los efectos producidos por la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica sobre la secreción de renina son directos o están mediados por modificaciones en cualquiera de los parámetros renales. Recientes estudios realizados en riñones aislados y en cultivos celulares demuestran que los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos son capaces de inhibir directamente la liberación de renina.

#### **2.2.2.4.- Regulación por la angiotensina II**

El principal mecanismo hormonal regulador de la secreción de renina es el efecto inhibitor de la AII sobre ésta. Este mecanismo de retroalimentación negativa supone un autocontrol del sistema, ya que si se produce un aumento de la secreción de renina y con ello de la producción de AII, ésta va a ser capaz de autoregular su síntesis actuando sobre la secreción de renina.

### **2.3.- ANGIOTENSINOGENO**

El angiotensinógeno es el sustrato fisiológico de la renina y el único precursor conocido de la AI. Es una  $\alpha_2$ -glicoproteína plasmática con un peso molecular entre 50-60 Kd. Existen diferentes formas de angiotensinógeno de las que se ha detectado su ARNm en

varios tejidos como el hígado, el cerebro, el riñón, el corazón, el pulmón o las glándulas adrenales (Samani y cols., 1988). Sin embargo, es en el hígado donde mayoritariamente se sintetiza el angiotensinógeno plasmático, que se secreta al torrente circulatorio de forma casi constante. La síntesis hepática de angiotensinógeno se ve estimulada por los glucocorticoides, los estrógenos, los andrógenos, las hormonas tiroideas y también por las interleucinas en los procesos de inflamación aguda. Por el contrario, tanto el déficit de hormonas suprarrenales, como la hipofisectomía o la tiroidectomía disminuyen su producción. Asimismo, algunos componentes del SRA también van a influir sobre la secreción de angiotensinógeno. La AII parece tener un efecto estimulador, actuando como un mecanismo de retroalimentación positivo sobre la síntesis de angiotensinógeno (Blair y cols., 1978), mientras que la renina puede inhibir su liberación (Herrmann y Dzau, 1983).

#### **2.4.- ANGIOTENSINA I**

La AI es un péptido formado por los diez primeros aminoácidos de la molécula de angiotensinógeno como consecuencia de la acción enzimática de la renina principalmente, pero también de otras enzimas a las que se ha hecho referencia en el apartado 2.1.1. (Dzau y cols., 1993). En realidad la AI puede ser considerada como una prohormona ya que no presenta acciones biológicas importantes. Sin embargo, en determinadas circunstancias se le ha atribuido capacidad para estimular tanto la secreción de la vasopresina (Peach, 1977) como de las catecolaminas (Goodfriend, 1983).

#### **2.5.- ENZIMA DE CONVERSION DE ANGIOTENSINA**

La ECA es una dipeptidil-carboxilasa que actúa sobre la AI escindiendo un dipéptido para generar el octapéptido AII. Es una glicoproteína ácida compuesta por una sola cadena polipeptídica que contiene  $Zn^{2+}$  en su molécula. Se han descrito dos formas endoteliales distintas de la ECA unidas a la membrana celular, con un peso molecular entre 150-180Kd y una forma testicular de 90 Kd. También existe una forma soluble probablemente derivada del endotelio vascular. La ECA se encuentra principalmente en la superficie de las células endoteliales vasculares del pulmón, por lo que la formación de AII tiene lugar fundamentalmente en la circulación pulmonar. Además de la pared vascular, la ECA también

está presente en la mayor parte de los tejidos periféricos como el riñón, el cerebro, las glándulas suprarrenales, el hígado, los testículos y el corazón. La AI no es el único sustrato sobre el que puede actuar la ECA, ya que se ha demostrado que *in vitro* también puede tener acción sobre una gran variedad de péptidos, como la Bk, la sustancia P, la neurotensina, la hormona liberadora de la hormona luteinizante ó LHRH y las encefalinas. *In vivo* la ECA se comporta de forma más selectiva, dependiendo de su afinidad por el péptido y de su concentración relativa, y sólo existen evidencias de su acción sobre la AI y la Bk. Este hecho sugiere que esta enzima es similar o la misma que la dipeptidil-hidrolasa, Cininasa II, que inactiva la Bk. De esta forma, la ECA puede establecer un balance entre la formación de un factor vasoconstrictor como la AII y uno vasodilatador como la Bk. La actividad de la enzima depende en gran medida de la presencia de iones monovalentes, como el ión Cl<sup>-</sup> que parece ser necesario para su actividad. La ECA también puede verse afectada por agentes quelantes como el EDTA o el EGTA que la inactivan, y por cationes como el Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> que sustituyen los Zn<sup>2+</sup> requeridos para la actividad catalítica de la enzima. Se ha observado además, que la expresión de la ECA endotelial y su actividad está regulada negativamente por los niveles plasmáticos de AII, lo que supondría un mecanismo de control de su propia producción por parte de la AII (Schunkert y cols., 1993). Así, durante el tratamiento prolongado con IECAs se ha encontrado una expresión estimulada en pulmón, probablemente dependiente de la falta de control por parte de la AII.

## 2.6.- ANGIOTENSINA II

### 2.6.1.- Receptores de angiotensina II

La AII ejerce sus acciones a través de su unión a receptores específicos. Se han descrito varios tipos de receptores para la AII (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AT<sub>3</sub>, AT<sub>n</sub>) pero los más conocidos en la actualidad son los AT<sub>1</sub> y los AT<sub>2</sub>. Los receptores AT<sub>1</sub> se localizan principalmente en los vasos, el riñón, el corazón, el cerebro, el útero, los adipocitos, el ovario, el bazo y el pulmón (Kakar y cols., 1992). Los receptores AT<sub>2</sub>, se han detectado fundamentalmente en tejidos embrionarios o en crecimiento, y en individuos adultos se han encontrado en la pared vascular, las glándulas adrenales, el sistema nervioso central, el miometrio y en los folículos ováricos atresicos.

### **2.6.1.1.- Receptores AT<sub>1</sub>**

El receptor AT<sub>1</sub> pertenece a la familia de receptores acoplados a las proteínas G o proteínas fijadoras de guanosintrifosfato, que incluye a los receptores para otros factores vasoconstrictores como la NA, la A, la dopamina, la vasopresina, la serotonina, la ET o la trombina. El receptor AT<sub>1</sub> presenta siete dominios transmembranarios, localizándose el grupo carboxi-terminal a nivel citoplasmático y el grupo amino terminal glicosilado a nivel extracelular. La AII se une a la superficie externa del receptor AT<sub>1</sub> que activa la proteína Gq $\alpha$ . Posteriormente se activa la fosfolipasa C que a su vez hidroliza el fosfatidil-4,5-bifosfato, formándose inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> actúa sobre receptores específicos localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico y facilita la liberación del calcio allí almacenado, y la posterior entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio de la membrana celular, cuyo resultado es un aumento de la concentración intracelular de calcio. El aumento de la concentración de calcio intracelular a nivel del músculo cardíaco aumenta la contractilidad y la frecuencia cardíaca, a nivel del músculo liso vascular aumenta el tono arterio-venoso y a nivel adrenal aumenta la síntesis de aldosterona. A su vez, el DAG activa y transloca la proteína cinasa C hacia la membrana celular donde estimula la fosforilación de diversas proteínas, activa el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y la fosfolipasa A<sub>2</sub> que aumenta la síntesis de eicosanoides. Además favorece la expresión de distintos factores de transcripción (Erg-1, c-fos, c-jun) y cierra diversos canales de K<sup>+</sup>. Este último efecto despolariza la membrana y conduce a la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo-L, lo que también conduce a un aumento de la contractilidad cardíaca y del tono vascular. Además de los efectos mencionados, la estimulación de los receptores AT<sub>1</sub> en el hígado o en la hipófisis puede activar proteínas Gi $\alpha$  que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles celulares de AMPc.

### **2.6.1.2.- Receptores AT<sub>2</sub>**

El receptor AT<sub>2</sub> presenta también una estructura con siete dominios transmembranarios. Tiene poca homología (34%) con el receptor AT<sub>1</sub> y la transducción de la señal no parece estar asociada a la activación de los fosfoinositoles o al incremento en la concentración intracelular de calcio. La posibilidad de que la transmisión de la señal de los

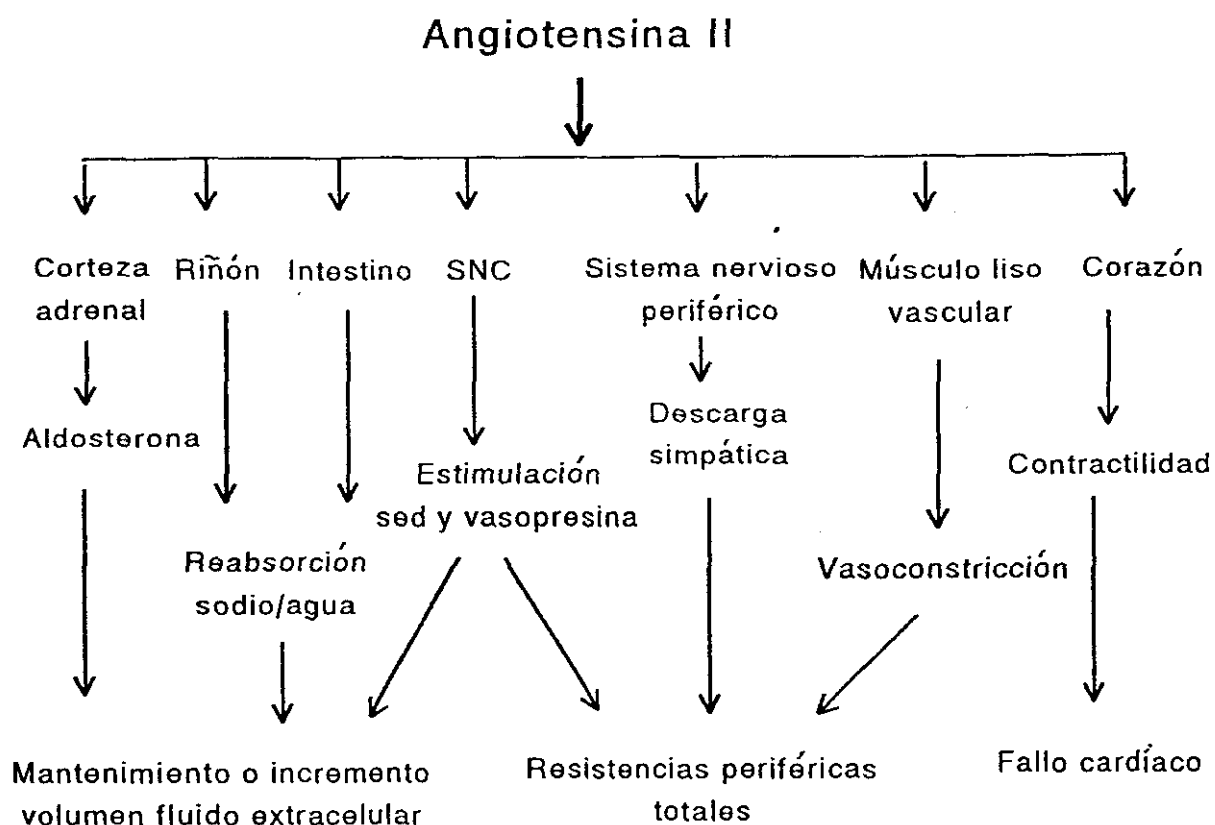


receptores  $AT_2$  implique la activación de proteínas G no está totalmente aclarada y los estudios realizados hasta ahora son contradictorios. En cultivos de distintos tipos celulares donde se expresan los receptores  $AT_2$  se ha demostrado que su estimulación por la AII puede afectar a la actividad guanilato ciclasa. En estudios recientes también se ha señalado que la unión de la AII a su receptor  $AT_2$  conduciría a la activación de la enzima tirosin fosfatasa que inhibe la fosforilación de diversas proteínas.

### **2.6.2.- Acciones de la angiotensina II**

La utilización de los nuevos antagonistas específicos de los receptores  $AT_1$  ha permitido comprobar que la mayoría de las acciones características de la AII, es decir, aquellas que ejerce sobre órganos diana como el riñón, el corazón, los vasos arteriales, el SNC y periférico, y las glándulas adrenales, parecen estar mediadas a través de la estimulación de este tipo de receptores (Timmermas y cols., 1993), por los que la AII tiene una mayor afinidad (Figura 5). Dichas acciones, de una manera directa o indirecta, afectan a la homeostasis cardiovascular y renal y como consecuencia participan en el desarrollo y mantenimiento de patologías como la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca, el infarto de miocardio, la hemorragia cerebral, la insuficiencia renal o la nefropatía diabética.

Aunque se desconoce en gran medida el papel funcional de los receptores  $AT_2$ , la marcada expresión de éstos en tejidos embrionarios ha llevado a suponer que podrían jugar un papel importante en el crecimiento y desarrollo celular, particularmente durante el periodo fetal y que podrían sobreexpresarse en ciertas situaciones patológicas. Además, teniendo en cuenta que la AII presenta una mayor afinidad por los receptores  $AT_1$  que por los  $AT_2$ , las acciones inducidas por estos últimos podrían tener una especial relevancia cuando se encuentran bloqueados los primeros durante el tratamiento con antagonistas de los receptores  $AT_1$ . Mediante la utilización de antagonistas específicos de los receptores  $AT_2$  se les ha atribuido a éstos acciones opuestas a las que inducen los receptores  $AT_1$  tanto sobre la función vascular como renal. Entre sus acciones vasculares se ha descrito que la unión de la AII a los receptores  $AT_2$  tendría un efecto vasodilatador (Scheuer y Perrone, 1993) y antiproliferativo sobre las células del músculo liso y las endoteliales (Stoll y cols., 1995).



**Figura 5.-** Representación de la mayoría de las acciones características de la angiotensina II

#### **2.6.2.1.- Acciones de la angiotensina II sobre el sistema nervioso central y periférico**

En el SNC la AII participa en procesos tan diversos como los relacionados con la memoria, la atención, el comportamiento, la regulación vasomotora, la secreción de la vasopresina, el mecanismo de la sed y la secreción de adrenocorticotropina o ACTH (Phillips, 1987). Numerosos estudios han demostrado la existencia de receptores  $AT_1$  en zonas del SNC como el área postrema, área subformical, el bulbo raquídeo, el área preóptica, los órganos circunventriculares, el órgano vasculoso, la lámina terminal, el núcleo del tracto solitario y los núcleos supraóptico y paraventricular. En la mayoría de estas áreas desencadena una serie de acciones relacionadas de una forma más o menos directa con la

regulación de la PA y del equilibrio hidroelectrolítico, interaccionando con distintos neurotransmisores como las catecolaminas, la Ach, la dopamina, la serotonina y el GABA.

La administración intracerebroventricular de AII aumenta la PA, la liberación de vasopresina y produce sed. Estudios *in vitro* e *in vivo* también han sugerido que la liberación de vasopresina por la AII implica vías catecolaminérgicas en el cerebro, ya que la administración de AII en el núcleo paraventricular produce la liberación tanto de NA como de vasopresina, que se bloquea en presencia de un antagonista específico de los receptores AT<sub>1</sub>. La administración de AII en ratas deprivadas de agua produce un aumento dosis-dependiente de la ingesta acuosa, que se inhibe también con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub>. Diversos estudios además han puesto de manifiesto la relación existente entre la AII a nivel central y la ingesta de sal. De hecho, se ha sugerido que el SRA central es sensible a aumentos de la ingesta de sal en pacientes con sensibilidad a la sal y se ha propuesto que las alteraciones de este SRA podrían contribuir a la llamada hipertensión sensible a la sal.

A nivel periférico la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub> puede modular la función simpática neural por múltiples mecanismos. La AII amplifica o facilita la actividad del SNS, por lo que este mecanismo contribuye a la acción vasoconstrictora de la AII. Esta acción facilitadora actúa a nivel presináptico, mediante un incremento de la biosíntesis y liberación de catecolaminas en los terminales nerviosos, una reducción de su recaptación y un aumento de la biosíntesis de catecolaminas por la médula adrenal (Hano y cols., 1994; Khairallah, 1972; Roth, 1972). A nivel postsináptico la AII potencia el efecto contráctil de la NA mediante la "sensibilización" de los receptores a esta amina. Se ha observado además, que la AII es capaz de activar la expresión de los receptores postsinápticos  $\alpha_2$ , por lo que éste podría ser el mecanismo de potenciación de la respuesta inducida por la NA.

#### **2.6.2.2.- Acciones vasculares de la angiotensina II**

##### **2.6.2.2.1.- Acciones sobre la contracción del músculo liso vascular**

La AII participa en la regulación del tono vascular mediante su acción vasoconstrictora del músculo liso vascular y por su acción facilitadora de la transmisión

adrenérgica. La AII aumenta el calcio libre citosólico, estimulando su entrada desde el espacio extracelular a través de canales tipo L o T, o su salida de los depósitos intracelulares. El calcio se une a la calmodulina activando la cinasa de la cadena ligera de la miosina, la cual a su vez cataliza la fosforilación de la miosina. Ello supone el establecimiento de la interacción actina-miosina y la contracción del músculo liso vascular (Dzau, 1986).

#### 2.6.2.2.2.- *Acciones sobre el crecimiento vascular*

Las acciones de la AII sobre el crecimiento vascular afectan a células tan diversas como las células musculares lisas, las células endoteliales o los fibroblastos. Ello posibilita la formación de nuevos capilares o angiogénesis, pero también el engrosamiento patológico de la pared vascular. Dicho engrosamiento se produce principalmente en el espacio subintimal y en la capa media, y se asocia a una acumulación anómala de colágeno en la adventicia. Las modificaciones estructurales de la pared arterial pueden ser debidas a tres procesos distintos: la hipertrofia, la hiperplasia y el remodelado de los componentes de la pared vascular (Mulvany y Aalkjaer, 1990; Heagerty, 1991). En general todos estos procesos suponen un incremento del cociente entre el grosor de la capa media y el diámetro de la luz del vaso debido a un aumento del grosor de la media, a una disminución del diámetro de la luz, a ambos a la vez, o simplemente a una reorganización de la pared del vaso que reduce la luz de éste, sin que exista proliferación celular o hipertrofia. Estas alteraciones de la estructura vascular tiene importantes repercusiones no sólo morfológicas, sino también funcionales para diversos órganos como el corazón, el SNC y el riñón.

La AII, junto con el estrés hemodinámico que tiene lugar en la hipertensión arterial, es uno de los principales factores causantes de las alteraciones morfológicas de la pared vascular (Heagerty, 1991). Las acciones de la AII sobre el crecimiento de la pared vascular dependen de la activación de los receptores  $AT_1$  en las células musculares lisas. Es importante destacar que las señales intracelulares puestas en marcha por la AII, a corto plazo median la vasoconstricción, pero a largo plazo modifican la expresión génica promoviendo la síntesis de ADN y de proteínas. La AII también es capaz de estimular la producción y la acción de factores mitogénicos como el bFGF, el PDGF, el VEGF o el factor de

crecimiento tumoral ( $TGF\alpha$ ) que estimulan la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de proteínas. La AII, a través de la estimulación de los receptores  $AT_1$ , también parece jugar un importante papel en la formación, migración y proliferación subendotelial de las células musculares lisas de la media que forman la neointima en respuesta al daño vascular producido por la angioplastia.

#### *2.6.2.2.3.- Acciones sobre el proceso aterogénico*

Numerosas evidencias indican que la AII puede ser considerada como un factor proaterogénico ya que influye en diversos mecanismos que participan en la iniciación y en el desarrollo de la aterosclerosis. Debido a su efecto vasoconstrictor la AII aumenta las resistencias periféricas y por tanto la PA, favoreciendo el desarrollo de una lesión endotelial que es una pieza clave en el inicio del proceso aterosclerótico. Asimismo, induce agregación plaquetaria, inhibe la activación del plasminógeno, es un factor quimiotáctico para linfocitos mononucleares y aumenta la permeabilidad de la pared arterial. También hay que destacar que la AII aumenta la producción de aniones superóxido (Griendling y cols., 1994) y con ello la peroxidación lipídica; la formación de células espumosas también se ve estimulada por la AII, ya que aumenta el número de receptores para LDL oxidadas en la membrana de los macrófagos y la captación de las lipoproteínas por éstos (Keidar y cols., 1993). Además hay que destacar que la AII, directa o indirectamente a través de la estimulación de los factores de crecimiento de acción local, estimula la proliferación y la migración de las células musculares lisas y la producción de colágeno, elastina y proteoglicanos por la pared vascular, lo cual favorece la formación de la lesión aterosclerótica.

#### *2.6.2.3.- Acciones de la angiotensina II sobre el corazón*

##### *2.6.2.3.1.- Acciones sobre la función cardíaca*

En el corazón la AII, a través de los receptores  $AT_1$ , ejerce un efecto inotrópico y cronotrópico positivo que conduce a un aumento del gasto cardíaco (Dzau y Re 1987) y dichas acciones tienen lugar con cantidades de AII que carecen de efecto vasoconstrictor. Recientemente se ha propuesto también que la AII generada localmente en el corazón

participa en la regulación de la comunicación entre cardiomiocitos y en la propagación del impulso cardíaco. Además de estas acciones directamente relacionadas con la función miocárdica, la AII va a participar en la regulación del flujo coronario mediante un efecto vasoconstrictor similar al descrito para el territorio arterial en general.

#### *2.6.2.3.2.- Acciones sobre el crecimiento miocárdico*

La hipertrofia ventricular izquierda y el engrosamiento de la pared vascular son fenómenos frecuentemente asociados a situaciones como la hipertensión, la aterosclerosis, o el envejecimiento. El aumento de la masa ventricular se debe, por un lado, a una hipertrofia de los miocitos producida por un incremento de la síntesis de proteínas contráctiles, y por otro, a una expansión intersticial producida por una síntesis anormal de fibras de colágeno por los fibroblastos. Se han propuesto distintos factores mecánicos y humorales como desencadenantes del crecimiento cardiovascular. La sobrecarga dinámica como consecuencia de la hipertensión, es el principal factor mecánico que afecta al miocardio, pero también diversos agentes vasoactivos, entre los que cabe destacar por su importancia a la AII (Neyses y cols., 1993), ejercen su función trófica sobre los cardiomiocitos independientemente de su acción presora. Tanto los factores mecánicos como los humorales como la AII, promueven señales intracelulares que aumentan la expresión de protooncogenes como el c-jun, c-myc o el c-fos que estimulan la síntesis ulterior de proteínas actuando a tres niveles: codificando la síntesis de factores de crecimiento, codificando la síntesis de receptores para los factores de crecimiento y codificando la síntesis de factores de transcripción (Komuro y Yazaki, 1993). Todo ello conduce a una hipertrofia de los cardiomiocitos y a la aparición de fibrosis intersticial que lleva al desarrollo de la hipertrofia ventricular.

#### *2.6.2.4.- Acciones renales de la angiotensina II*

##### *2.6.2.4.1.- Acciones sobre la hemodinámica renal y la filtración glomerular*

La AII ejerce una acción vasoconstrictora selectiva sobre la arteriola eferente (Hall, 1986a). Ello no implica que no se produzca vasoconstricción aferente, ni que no existan

receptores a este nivel, sino que la acción vasoconstrictora de la AII se encuentra compensada por factores vasodilatadores como la PGI<sub>2</sub> y el NO, que ejercen una acción protectora sobre esta arteriola, ante aumentos de la AII. El hecho de que la AII produzca contracción sobre la arteriola eferente principalmente, supone una disminución del flujo sanguíneo renal (FSR) pero un mantenimiento de la TFG (Romero y Knox, 1988). Por ello, la activación del SRA es importante para la regulación de la TFG en situaciones como la ingesta baja de sodio, la estenosis de la arteria renal o la insuficiencia cardíaca. La vasoconstricción de la arteriola eferente es un mecanismo indirecto por el que la AII disminuye la natriuresis, ya que el descenso del FSR sin cambios en la TFG va a aumentar la fracción de filtración, produciendo una mayor reabsorción de agua y electrolitos en el túbulo proximal. Esto, a su vez, provoca la disminución del volumen del fluido tubular que llega a la porción descendente del asa de Henle y por consiguiente permite que aumente la osmolaridad de la médula renal y de la orina. Otro mecanismo indirecto por el que la AII ejerce su efecto antinatriurético es mediante la reducción del flujo sanguíneo medular como consecuencia de su efecto vasoconstrictor sobre la arteriola eferente de las nefronas yuxtamedulares y de los vasos rectos. Este efecto unido al incremento de la osmolaridad intersticial medular, hace que aumente la capacidad de concentración de la orina (Hall, 1986a; Hall, 1986b; Hall y cols., 1980).

La A II participa además en el proceso de autorregulación renal, que consiste en el mantenimiento del FSR y de la TFG cuando se modifica la presión de perfusión renal. Cuando se produce una reducción de la PA y por tanto de la presión de perfusión renal, disminuye la presión hidrostática glomerular y con ella la filtración glomerular. Como consecuencia, la concentración de ClNa que alcanza la mácula densa se reduce estimulando la secreción de renina y por tanto de AII, que aumenta la vasoconstricción eferente elevando la presión hidrostática glomerular y ayudando a mantener la TFG.

#### *2.6.2.4.2.- Acciones tubulares*

La AII es uno de los factores con mayor efecto antinatriurético, ya que es capaz de disminuir la natriuresis a niveles casi indetectables. Además de los efectos hemodinámicos con consecuencias para la función excretora renal mencionados, la AII aumenta de forma

directa la reabsorción de sodio en varias porciones de la nefrona, como el túbulo proximal y el segmento ascendente del asa de Henle, a través de la reducción de la concentración intracelular de AMPc y el incremento del contratransporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Se ha demostrado que la administración por micropuntura de un antagonista del receptor  $\text{AT}_1$  inhibe la reabsorción de sodio, bicarbonato, cloruro y agua en el túbulo proximal, dando lugar a una marcada diuresis, natriuresis y cloruresis; evidenciando así el importante papel de la AII y de los receptores  $\text{AT}_1$  en la regulación de la reabsorción de fluido y electrolitos en el túbulo proximal (Cogan y cols., 1991). El efecto tubular de la AII sobre la reabsorción de agua y sodio además tiene una gran importancia en el mecanismo de presión diuresis/natriuresis. Como se ha señalado anteriormente, el aumento de la presión de perfusión renal conlleva una disminución de la AII intersticial que afecta a la acción del péptido sobre la reabsorción tubular de sodio, por lo que ésta disminuye y se produce el característico incremento de diuresis y natriuresis que acompaña al aumento de la presión de perfusión renal.

#### ***2.6.2.5.- Acciones de la angiotensina II sobre la corteza adrenal***

Tradicionalmente se ha considerado que las acciones antinatriuéticas del SRA son debidas principalmente a la acción de la aldosterona, ya que la AII es uno de los principales estímulos para la síntesis y liberación de la aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza adrenal. Sin embargo, se ha demostrado que pequeños aumentos de AII intrarrenal a dosis no presoras, producen cambios considerables de la natriuresis que no se acompañan de modificaciones de la concentración plasmática de aldosterona (Kanagy y cols., 1990). Por tanto, la participación de la aldosterona en la acción antinatriurética de la AII en condiciones normales parece ser secundaria, aunque hay que destacar que la aldosterona contribuye a evitar una pérdida excesiva de sodio en situaciones de una ingesta pobre en sal. Actualmente se piensa que las acciones directas de la AII sobre la función renal tienen más relevancia para la homeostasis electrolítica, desde un punto de vista cuantitativo, que los efectos producidos por la aldosterona.



## **2.7.- INTERRELACIONES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CON OTROS FACTORES VASOACTIVOS**

El SRA tiene relaciones con numerosos sistemas vasoactivos como el sistema caliceína-cininas, el péptido natriurético atrial, el SNS y las catecolaminas. Debido al interés creciente y a la importancia de los factores vasoactivos derivados del endotelio, se han realizado numerosos estudios que han puesto de manifiesto también la existencia de una serie de interrelaciones entre estos factores y el SRA con repercusión cardiovascular y renal.

La AII estimula la síntesis y liberación de PGs en diversos órganos como el riñón y distintos lechos vasculares (Blumberg, 1977; Nasjletti y Malik, 1982). La acción vasodilatadora y natriurética de las PGs como la PGI<sub>2</sub> y la prostaglandina E<sub>2</sub> tendería a antagonizar las acciones de la AII, modulando su respuesta vascular y renal (Mullane y Moncada, 1980; Nasjletti y Malik, 1982). Además, la síntesis de PGI<sub>2</sub> en el riñón ocurre preferentemente a nivel de la arteriola aferente, en estrecho contacto con las células yuxtaglomerulares productoras de renina, por lo que esta asociación anatómica también permite a la PGI<sub>2</sub> a través del incremento de los niveles de AMPc, estimular la liberación de renina y por tanto de AII, participando en la autorregulación del FSR y de la TFG en respuesta a cambios de la presión de perfusión renal.

La AII aumenta la producción de TXA<sub>2</sub> cuyas acciones vasoconstrictora y antinatriurética contribuyen a mediar sus efectos renales y sistémicos (Welch y Wilcox, 1988; Wilcox y Welch, 1990). Se ha demostrado su participación en la respuesta constrictora de la AII en vasos aislados en distintos modelos de hipertensión en ratas (Lin y Nasjletti, 1991; Lang y cols., 1995) y en arteria cerebral de perro (Manabe y cols., 1989). También, el TXA<sub>2</sub> parece estar implicado en el origen y/o mantenimiento de la hipertensión dependiente de AII (Mistry y Nasjletti, 1990; Lin y cols., 1991). Así, la inhibición selectiva de la síntesis de TXA<sub>2</sub> o el bloqueo de sus receptores mejora la función renal y disminuye la PA en varias patologías relacionadas directa o indirectamente con la AII (Luft y cols., 1989; Mistry y Nasjletti, 1990). Lin y cols. (1991) y Yamaguchi y cols. (1992) han demostrado también que la respuesta vasodilatadora renal al bloqueo de los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> está íntimamente relacionada con el estado del SRA.

La AII y el NO presentan acciones opuestas en prácticamente todos los órganos, y se ha propuesto que el NO actuaría como el antagonista fisiológico de la AII a nivel vascular y renal (Gruetter y cols., 1988; De Nicola y cols., 1992), de forma que el mantenimiento de un equilibrio entre las acciones de ambos factores parece tener una especial relevancia para la homeostasis cardiovascular y renal. La AII es capaz de estimular la síntesis de NO en células endoteliales de aorta y microvasos coronarios (Seyedi y cols., 1995; Wiemer y cols., 1993) lo que modularía su acción vasoconstrictora. A nivel renal desde un punto de vista anatómico, las células endoteliales y las del aparato yuxtaglomerular están muy próximas lo que permitiría un control paracrino de la renina por parte del NO. Se ha propuesto que el NO junto con el calcio podría ser la señal que uniese los cambios en la presión de perfusión renal en las arteriolas aferentes con la secreción de renina, explicando el mecanismo por el cual el incremento de la presión de perfusión puede inhibir la liberación de renina. Cuando aumenta la presión de perfusión renal en la arteriola aferente se produce vasoconstricción y un aumento de las fuerzas de cizallamiento de la sangre sobre las células endoteliales vasculares, que constituye uno de los principales estímulos físicos para la liberación del NO. Este NO puede difundir hacia las células yuxtaglomerulares aumentando la concentración de GMPc e inhibiendo la liberación de renina y por tanto la síntesis de AII.

La importancia de las interrelaciones entre el NO y la AII se pone de manifiesto cuando se encuentra inhibida de la síntesis de NO, ya que esto crea un desequilibrio que facilita la expresión de las acciones de la AII. Los efectos de la administración de un inhibidor de la NOS a animales de experimentación sobre la PA y las resistencias periféricas se previenen en gran medida por la administración de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (Pollock y cols., 1993). La AII y el NO interaccionan modulando la actividad glomerular y tubular, ya que la constricción arteriolar glomerular, la disminución del coeficiente de ultrafiltración y de la reabsorción tubular proximal producida por un inhibidor de la síntesis de NO, se previene también con la administración de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub>. Las interacciones entre AII y NO además afectan a la estructura de la pared vascular, ya que el crecimiento vascular inducido por la AII se acentúa en presencia de inhibidores de la síntesis de NO y en situaciones donde existe disfunción endotelial con menor producción de NO, así como el tratamiento con antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> previene el remodelado cardiovascular que se produce durante la inhibición crónica del NO en ratas (Takemoto y

cols., 1997).

La AII también puede incrementar la producción de ET-1 en lechos vasculares, el riñón y el corazón (Dohi y cols., 1992; Abassi y cols., 1993; Brunner y Kukovetz, 1996) y por tanto puede participar en la acción vasoconstrictora y en los efectos renales de la AII. Se ha comprobado también que la ET-1 puede mediar algunos de los efectos hipertróficos cardíacos de la AII (Ishiyé y cols., 1995) y que está implicada en la hipertensión dependiente de AII (d'Uscio y cols., 1997). Además se ha demostrado que la inhibición de la ECA reduce la secreción de ET-1 de células endoteliales cultivadas (Momose y cols., 1993). Por otro lado, la ET también es capaz de estimular la secreción de renina (Rakugi y cols., 1990) y de aumentar la actividad de la ECA (Kawaguchi y cols., 1991; Moroi y cols., 1996) en preparaciones vasculares por lo que puede incrementar la producción de AII (Rubanyi y Parker-Botelho, 1991).

## **2.8.- INTERVENCION FARMACOLOGICA SOBRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

El SRA participa decisivamente en el desarrollo y las complicaciones de diversas patologías cardiovasculares y renales como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal, la aterosclerosis, la nefropatía diabética, etc. Por ello, la inhibición de las acciones del SRA ha sido de gran importancia en el avance del tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y sigue siendo uno de los objetivos primordiales de la terapéutica cardiovascular y renal actual (Figura 6).

Historicamente, la inhibición de las acciones del SRA para el tratamiento de la hipertensión arterial se inició con la utilización de los  $\beta$ -bloqueantes adrenérgicos, fármacos que en principio no estaban pensados con este objetivo. Su efecto sobre el SRA se basa en el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos responsables de la estimulación de la secreción de renina en el riñón. Sin embargo, actualmente se sabe que sus efectos antihipertensivos no dependen de su acción sobre la actividad de la renina plasmática, ya que dicha acción es inmediata, mientras que su efecto antihipertensivo tarda días en manifestarse y este efecto sobre la PA es similar en pacientes con niveles altos o bajos de renina plasmática.

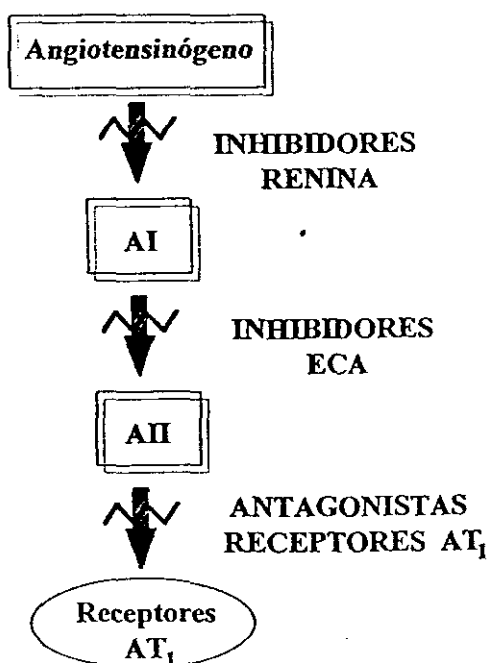


Figura 6.- Intervención farmacológica a distintos niveles sobre el sistema renina-angiotensina

### 2.8.1.- Inhibidores de la renina

Los inhibidores de la renina han sido uno de los puntos de interés en la inhibición de las acciones del SRA ya que bloquean uno de los pasos limitantes en la síntesis de la AII. Se han hecho diversos intentos para inhibir la acción de la renina. Una aproximación para bloquear sus acciones se hizo con la pepstatina, un potente inhibidor de la pepsina con menor capacidad para inhibir la renina. Se ha demostrado su acción antihipertensiva en ratas con hipertensión dependiente de renina, sin embargo debido a su relativa insolubilidad presenta una actividad intrínseca pequeña. Se han utilizado también anticuerpos específicos anti-renina que son capaces de reducir la PA (Dzau y cols., 1980), pero que cuyo uso terapéutico se ha visto limitado ya que necesitan administrarse por vía intravenosa y presentan problemas inmunológicos. Los únicos inhibidores que han conseguido tener una mayor relevancia en este campo son los análogos de sustrato, éstos se unen directamente a la renina formando un complejo enzima-inhibidor que la inactiva (Burton y cols., 1975). Se han sintetizado distintos análogos de sustrato, que tienen efectos antihipertensivos en

distintos tipos de hipertensión en el hombre y mejoran el perfil hemodinámico en la insuficiencia cardíaca congestiva cuando se administran por vía parenteral, aunque oralmente presentan poca actividad. Por último, ha aparecido una segunda generación de estos compuestos con mayor actividad oral y por tanto con mayores posibilidades terapéuticas, aunque todavía se necesita un conocimiento más amplio de sus efectos.

### 2.8.2.- Inhibidores de la Enzima de conversión de angiotensina

Los inhibidores de la ECA impiden directamente la formación de AII. Estos fármacos fueron desarrollados a partir de estudios realizados sobre extractos de veneno de la serpiente *Bothrops Jararaca*. Los IECAs han supuesto uno de los principales logros en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares en las que esta implicada la AII, tanto por su eficacia antihipertensiva (Biollaz y cols., 1982) como por su capacidad para mejorar muchas de las consecuencias de estas patologías. El mecanismo farmacológico de acción principal es la inhibición de la ECA (Dzau, 1990) y como consecuencia la reducción de la producción de la AII, y secundariamente la supresión de la secreción de la aldosterona por las glándulas suprarrenales. El principal sitio de actuación de los IECAs es la ECA del plasma y los tejidos, entre éstos el tejido vascular parece uno de los órganos diana importantes de actuación de los IECAs. Sin embargo, los estudios realizados con IECAs han suscitado la cuestión de si la ECA es indispensable para la formación de la AII *in vivo*, ya que se puede detectar fácilmente AII en plasma y en tejidos, a pesar de existir una inhibición de ésta (Mento y Wilkes, 1987). Estos estudios indican claramente que pueden estar actuando otros enzimas distintos de la ECA, responsables de la conversión de AI en AII, y que podrían tener una relevancia fisiopatológica importante.

Un efecto paralelo de los IECAs es la inhibición de la cininasa II, enzima químicamente idéntica a la ECA (Olsen y Arrigoni-Martelli, 1979; Erdös, 1990). Estos fármacos por tanto no sólo impiden la formación de AII, sino que también inhiben la degradación de las cininas como la Bk (Campbell y cols., 1994), por lo que parte de sus acciones parecen deberse al aumento de la disponibilidad de estos factores vasodilatadores (Carretero, 1981). Otra consecuencia de la acción de los IECAs es que se produce un incremento de renina y de AI en plasma (Todd y Heel, 1986) al interrumpirse el control de

retroalimentación negativo que ejerce la AII sobre ellos, que puede derivarse a otras vías enzimáticas generando otros productos como la A(1-7) (Luque y cols., 1996; Kohara y cols., 1993), que también podrían tener importancia en el mecanismo de acción de los IECAs, como se ha demostrado recientemente (Iyer y cols., 1998).

### 2.8.3.- Antagonistas de los receptores de A II

El primer antagonista de los receptores de AII sintetizado fue la Saralasin, un antagonista peptídico de la AII que sólo era eficaz por vía intravenosa (Pals y cols., 1971) y que presentaba efectos agonistas (Anderson y cols., 1977; Castellion y Fulton, 1979). Posteriormente se desarrollaron los antagonistas no peptídicos S-8307 y S-8308, que aunque eran menos selectivos, carecían de los efectos agonistas de la Salarasina. Tras estos primeros antagonistas no peptídicos, fueron sintetizados otros como el EXP9654, el EXP9270 y el EXP9020, que eran capaces de reducir la PA al ser administrados intravenosamente y eran más eficaces que la Salarasina al ser administrados oralmente.

Losartán, es el primero de una familia de potentes antagonistas específicos de la AII, de naturaleza no peptídica y activo por vía oral (Timmermans y cols., 1991; Rhaleb y cols., 1991). Este compuesto es una sal monopotásica de 2-N-Butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[2-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il] imidazol, que bloquea selectivamente los receptores AT<sub>1</sub> a través de los cuales, como se ha mencionado anteriormente, la AII ejerce la mayoría de sus efectos nerviosos, cardiovasculares y renales conocidos. Numerosos estudios indican que Losartán es eficaz disminuyendo la PA en pacientes hipertensos (Nelson y cols., 1992) y disminuye el daño en los órganos diana que se ven afectados por la hipertensión (Camargo y cols., 1991), pero a diferencia de la Salarasina, Losartán ha demostrado que carece de efectos agonistas en varios estudios en músculo liso vascular y diferentes lechos vasculares (Rhaleb y cols., 1991; Osei y Kadowitz, 1992; Chan y cols., 1992) y es capaz de bloquear los efectos agonistas de la Salarasina (Wong y cols., 1990). Además Losartán posee una alta afinidad por los sitios de unión de la A II en diferentes tejidos, como las glándulas adrenales, el cerebro, el riñón, el hígado, el pulmón y las células del músculo liso vascular de varias especies animales y en el hombre (Smith y cols., 1992; Timmermans y cols., 1991), pero no presenta afinidad por otros receptores hormonales como los receptores  $\alpha$  y

$\beta$ -adrenérgicos, los dopaminérgicos, los muscarínicos, los receptores de serotonina y otros, así como tampoco sobre los canales de calcio.

A diferencia de los IECAs, el tratamiento con Losartán produce un aumento de los niveles circulantes de AII (Goldberg y cols., 1993), cuyos efectos fisiológicos no se conocen todavía bien, aunque se ha sugerido que podrían estar relacionados con acciones derivadas de su unión a otros receptores distintos de los AT<sub>1</sub>, como los receptores AT<sub>2</sub> y/o con la estimulación de vías de degradación de la AII a otros productos como la A(1-7), la AIII o la AIV, que podrían mediar en parte los efectos de los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub>. En este sentido tanto los receptores AT<sub>2</sub> como la A(1-7) han sido implicados en las acciones de Losartán (Muñoz-García y cols., 1995; Iyer y cols., 1998).

### **3.- MODIFICACIONES DE LA FUNCION VASCULAR Y CONCEPTO DE DISFUNCION ENDOTELIAL**

Las alteraciones de la función vascular bien sean como causa o como consecuencia se han implicado en numerosas enfermedades cardiovasculares. Tanto la edad como la hipertensión están asociadas con distintas alteraciones en la función del sistema cardiovascular, a nivel de receptores de agentes vasoactivos, a nivel postreceptor, en la función neuromuscular, en la síntesis y liberación de los distintos factores locales, en los niveles circulantes de determinadas hormonas vasoactivas y a nivel de los reflejos autónomos.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre las acciones antagónicas de los distintos factores vasoactivos del que va a depender el mantenimiento del tono vascular y la adecuada perfusión de los tejidos y órganos (Raij, 1991). El endotelio vascular contribuye a mantener este equilibrio entre contracción y relajación del músculo liso vascular, así como también el equilibrio entre la estimulación y la inhibición de su crecimiento y la modulación de la función plaquetaria y la adhesión de monocitos, por lo que la integridad del endotelio es esencial para el funcionamiento normal de la pared vascular. Sin embargo, este equilibrio puede alterarse conduciendo al predominio de las acciones de los factores vasoconstrictores, proliferativos y proagregantes en detrimento de las acciones de los factores vasodilatadores,

antiproliferativos y antiagregantes. Esta situación cuando afecta a la funcionalidad del endotelio se conoce como disfunción endotelial y se puede definir como una serie de alteraciones de la síntesis, la liberación, la difusión o la degradación de los diversos factores derivados del endotelio, que va a variar en sus características dependiendo de la patología asociada, así como del lecho vascular que se considere (Lüscher y cols., 1992a). La disfunción endotelial se manifiesta como una reducida respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio y/o una mayor respuesta constrictora dependiente o independiente de endotelio (Lahera y cols., 1997). Asimismo la disfunción endotelial puede suponer también una mayor interacción de las plaquetas y monocitos con la pared vascular y un aumento del crecimiento y la migración de las células musculares lisas (Vane, 1994). La disfunción endotelial se ha asociado con el envejecimiento (Küng y Lüscher, 1995) y está presente en muchas situaciones patológicas como la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la hipercolesterolemia y la diabetes (Lüscher y cols., 1992a).

Las distintas patologías cardiovasculares además están relacionadas con alteraciones estructurales que varían también principalmente en función del territorio vascular estudiado. La heterogeneidad intervascular no se debe sólo a la diversidad de la inervación, a la actividad del endotelio y otras fuentes intravasculares de agentes bioactivos, sino que también puede residir en diferencias regionales del músculo liso vascular. Se pueden distinguir dos tipos principales de cambios estructurales: 1) alteraciones en la longitud y el número de microvasos y 2) cambios en el grosor y la organización de la pared vascular. Durante el envejecimiento y en la hipertensión tiene lugar una disminución del número de microvasos como pequeñas arteriolas y capilares en distintos tejidos (Prewitt y cols., 1982), fenómeno que se conoce como rarefacción; mientras que se produce un aumento progresivo del grosor de la pared arterial y/o modificaciones en su organización que conducen al remodelado de ésta (Haudenschild y Chobanian, 1984; Heagerty y cols., 1993).

### **3.1.- EFECTOS VASCULARES DEL ENVEJECIMIENTO**

Es un hecho conocido que la edad está asociada con un incremento de la incidencia de problemas cardiovasculares, como la hipertensión, la enfermedad coronaria o la insuficiencia cardíaca (Docherty, 1990). La presión arterial sistólica (PAS) incrementa con



la edad, mientras que la diastólica tiende a alcanzar un máximo estable e incluso a decaer en una edad avanzada (Kannel, 1987; Byyny, 1995). El envejecimiento se acompaña de una serie de cambios hemodinámicos entre los que destaca un aumento de las resistencias vasculares periféricas que finalmente tiene su traducción clínica en una mayor prevalencia de hipertensión arterial (Applegate, 1989; Frishman, 1991). El aumento de las resistencias periféricas con el envejecimiento puede ser secundario a un incremento en el grado de contracción del músculo liso arterial en respuesta a la prevalencia de estímulos neurohumorales (Vanhoutte 1988), así como a alteraciones en la función del endotelio como regulador del tono del músculo liso (Dohi y Lüscher, 1990). La edad también causa un aumento en el grosor y una pérdida de distensibilidad en las grandes arterias (Michel y cols., 1994), y un estrechamiento vascular en los vasos de resistencia que podría también conducir al aumento de las resistencias periféricas.

La pérdida de función endotelial no sólo es característica de patologías como la hipertensión o la aterosclerosis, sino que como ya se ha mencionado también se ha asociado con el envejecimiento. Estudios experimentales indican que independientemente de la existencia de otras patologías, la edad parece empeorar la relajación dependiente de endotelio tanto en la aorta como en pequeñas arterias de resistencia en ratas (Moritoki y cols., 1986; Koga y cols., 1988; Koga y cols., 1989; Fujii y cols., 1993; Mayhan y cols., 1990) y en el hombre (Hollenberg y cols., 1974; Taddei y cols., 1995). Se han propuesto varios mecanismos para explicar la reducción en la respuesta vasodilatadora que acompaña al envejecimiento (Figura 7), entre ellos, cambios en las propiedades elásticas de los vasos, o alteraciones de la vasoconstricción o vasodilatación mediada por receptores específicos (Vanhoutte, 1988; Docherty, 1990). Varios estudios han sugerido que las alteraciones en la relajación dependiente de endotelio con la edad podrían deberse a una menor producción de NO (Moritoki y cols., 1986), al igual que una menor biosíntesis de PGI<sub>2</sub> (Tukunaga y cols., 1991) y también a una menor liberación de EDHF (Fujii y cols., 1993). Sin embargo, los datos experimentales obtenidos hasta el momento no son concluyentes, ya que algunos autores no han encontrado diferencias o han observado un aumento en la producción de alguno de estos factores con la edad (Tank y cols., 1994). También se ha sugerido que esta hiporrespuesta relajante dependiente de endotelio podría ser consecuencia de una estimulada liberación de eicosanoides vasoconstrictores como el TXA<sub>2</sub> o la PGH<sub>2</sub> (Dohi y cols., 1990;

Küing y Lüscher, 1995) y/o de una mayor producción de radicales libres como aniones superóxido durante el envejecimiento, ya que éstos tienen la capacidad de oxidar el NO produciendo peroxinitritos que presentan una potente acción oxidante y producen daño celular a nivel estructural y molecular (Rubanyi y Vanhoutte, 1986). Esto podría explicar también la disminución de la relajación dependiente de endotelio aunque la producción de los factores vasodilatadores no estuviera afectada con al edad. Sin embargo, la falta de uniformidad en los resultados de los distintos estudios mantiene sin esclarecer por completo las causas y la naturaleza del daño endotelial en el envejecimiento.

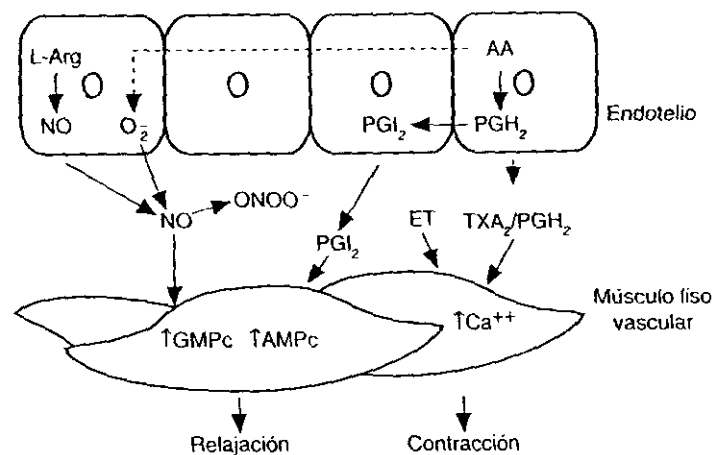


Figura 7.- Disfunción endotelial en el envejecimiento y la hipertensión: posibles factores implicados

No existen tampoco datos concluyentes en relación a las alteraciones de la respuesta vasoconstrictora con la edad. Así, los efectos del envejecimiento sobre la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica observados en animales son contradictorios (Wanstall y O'Donnell, 1988; Feletou y cols., 1993; Duckles, 1983; Duckles y cols., 1985). Tampoco se ha encontrado una uniformidad de resultados sobre los efectos derivados del envejecimiento respecto a la respuesta contráctil inducida por la AII (Hynes y Duckles, 1987; Toda y cols., 1986a; Wakabayashi y cols., 1990) en distintas arterias aisladas de diferentes especies animales. Los datos son más homogéneos, sin embargo, en el caso de la respuesta a serotonina (Toda y Hayashi, 1979; Tsujimoto y cols., 1986; Toda y cols., 1986b; Feletou y cols., 1993) y la contracción dependiente de endotelio a la Ach (Koga y cols., 1988; Koga y cols. 1989) que

parecen estar incrementadas con la edad, o la contracción a la ET-1 que está disminuida durante el envejecimiento (Dohi y Lüscher, 1990; Filipelli y cols., 1993; Kung y Lüscher, 1995; Lüscher y cols., 1992b). También la respuesta a potasio parece estar reducida (Wanstall y O'Donnell, 1989; Cohen y Berkowitz, 1976) o no modificada (Feletou y cols., 1993) con la edad. Además se ha observado un menor efecto inhibitor del endotelio sobre las contracciones inducidas por NA, serotonina y ET en arterias mesentéricas y en aorta de rata con el envejecimiento (Vanhoutte, 1988).

La edad también está asociada con marcados cambios en la estructura del sistema cardiovascular. Durante el envejecimiento tiene lugar un incremento de la masa cardíaca, y una disminución de su distensibilidad, que reducen la funcionalidad cardíaca. Asimismo las arterias empiezan a ser menos elásticas, hay una pérdida de fibras elásticas y una acumulación de colágeno y minerales, que conduce a procesos de fibrosis, esclerosis y calcificación que reducen la distensibilidad arterial (Wei, 1992). También tiene lugar un progresivo engrosamiento miointimal y un decremento de la relación lumen/pared (Byyny, 1995; Docherty, 1990). El envejecimiento además produce un aumento de la adhesividad plaquetaria y de monocitos a la pared vascular (Hollenberg y cols., 1974; Wei, 1992; Haudenschild y cols., 1981; Haudenschild y Chobanian, 1984) y facilita la acumulación de componentes lipídicos y/o proteínicos del plasma en el espacio subendotelial, lo que constituye un punto de unión entre la edad y el proceso ateromatoso, aunque estos efectos se van a producir también independientemente de la presencia de aterosclerosis (Wadsworth, 1990; Abrams, 1988). Funcionalmente, estos cambios estructurales de la íntima que aparecen con la edad, pueden conducir a un aumento de la permeabilidad vascular (Belmin y cols., 1993) y a una menor respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio (Koga y cols., 1988) facilitando la vasoconstricción, produciendo un incremento de la resistencia inducida por los vasoconstrictores en los pequeños vasos (Folkow y cols., 1973).

### **3.2.- EFECTOS VASCULARES DE LA HIPERTENSION**

La hipertensión es probablemente una de las enfermedades cardiovasculares más comunes. Hemodinámicamente hablando la PA está determinada por el gasto cardíaco, que depende tanto del volumen de sangre como del rendimiento cardíaco, así como por el tono

vascular, que determina la resistencia vascular periférica. La mayor resistencia al flujo se encuentra en las pequeñas arteriolas del sistema vascular que tienen una poderosa pared muscular que les permite modificar su calibre variando el flujo de sangre hacia los capilares y por tanto a los tejidos. La función cardíaca puede variarse modificando el volumen de las venas mayores (vasos de capacitancia), influyendo, por lo tanto, en el llenado cardíaco, y/o mediante la regulación de la fuerza contráctil cardíaca y/o la frecuencia cardíaca (Guyton y cols., 1973). Existen múltiples y complejos sistemas de retroalimentación que controlan tanto el tono vascular, y por tanto el grado de resistencia, como el gasto cardíaco y el volumen de los líquidos corporales para mantener la PA dentro de sus límites fisiológicos. Las alteraciones en los distintos sistemas que intervienen en la regulación de la PA pueden conducir al desarrollo y al mantenimiento de la hipertensión.

La PA elevada en la hipertensión crónica está acompañada por un incremento en la resistencia vascular periférica total. Esta elevación de las resistencias periféricas en la hipertensión mantenida puede ser consecuencia de alteraciones funcionales como un incremento de la actividad simpática en las arterias de resistencia, de cambios en la reactividad vascular a sustancias vasoconstrictoras o vasodilatadoras, o de alteraciones en los mecanismos de control del tono vascular dependientes del endotelio, así como de modificaciones estructurales. Aunque es un hecho conocido que los cambios en la estructura del sistema cardiovascular se producen como consecuencia de adaptaciones al incremento de la PA (Mulvany y Aalkjaer, 1990), también el engrosamiento y/o remodelado patológico de la pared vascular que incrementa la rigidez y estrecha la luz arterial pueden producir una elevación de las resistencias periféricas y contribuir al aumento de la PA (Folkow y cols., 1973). Por esta razón, el desarrollo de la hipertrofia cardiovascular y de la disfunción arterial en la evolución de la hipertensión en el hombre o en animales de experimentación no está del todo claro y las interrelaciones entre las alteraciones vasculares estructurales y funcionales con el desarrollo de la hipertensión, así como su relación de causa-efecto permanecen todavía en debate.

Las alteraciones funcionales asociadas a la hipertensión que se producen en la vasculatura son similares en su mayoría a las que han sido descritas como consecuencia de la edad, por lo que algunos autores postulan que la hipertensión podría ser considerada como

un proceso de envejecimiento prematuro de los vasos sanguíneos. La hipertensión, como la edad, parece causar un decremento de las relajaciones dependientes de endotelio en arterias de resistencia (Dohi y cols., 1990; Tesfamarian y Halpern, 1988; Fujii y cols., 1992), renales (Ito y Carretero, 1992) y en la aorta (Lograno y cols., 1989; Lüscher y Vanhoutte, 1986; Tesfamarian y Ogletree, 1995) en distintos modelos experimentales. Numerosos estudios han demostrado que también existe un incremento de la contracción dependiente de endotelio (Mayhan y cols. 1989, Lüscher y Vanhoutte, 1986; d'Uscio y cols., 1997) tanto en arterias de conducción como en arterias de resistencia en varios tipos de hipertensión experimental (De Mey y Gray, 1985, Mayhan y cols. 1989, Dohi y cols. 1990). Alteraciones de la relajación y de la contracción dependiente de endotelio similares se han observado en la arteria braquial de pacientes con hipertensión esencial (Linder y cols. 1990, Panza y cols., 1990; Panza y cols. 1993; Taddei y cols., 1993b). La hipertensión también parece incrementar la respuesta a la estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica en arterias de resistencia (Folkow, 1990; Dohi y cols., 1990), sin embargo esta respuesta no está alterada en los grandes vasos de conducción como la aorta en ratas (Iwama y cols., 1992; Kung y Lüscher, 1995). En la arteria braquial de pacientes hipertensos esenciales también se ha observado un incremento de la respuesta vasoconstrictora tanto a la estimulación  $\alpha_1$  como a  $\alpha_2$ -adrenérgica (Jie y cols., 1986). En ratas hipertensas la respuesta contráctil a potasio (Cheng y Shibata, 1980; Holloway y Bohr, 1973) a A II (Collis y Vanhoutte, 1978) y a varios cationes (Bohr, 1974) también parecen estar estimuladas en varios tipos de vasos.

La hipertensión en la SHR, un modelo de hipertensión genética experimental que reproduce muchas de las características de la hipertensión esencial en el hombre (Trippodo y Frohlich, 1981), está asociada con disfunción endotelial caracterizada también por una disminución de la relajación y un aumento de la contracción dependientes de endotelio (Figura 7). Esta disfunción en la SHR parece ser debida a un incremento de la producción de un factor endotelial constrictor, junto a una producción normal o ligeramente reducida de NO, ya que la administración de Ach produce la misma caída de PA en la SHR que en la WKY (Lahera y cols., 1993), si bien la relajación a Ach en anillos aortícos es menor en los animales hipertensos que en los normotensos (Lüscher y Vanhoutte, 1986; Kung y Lüscher, 1995). La contracción dependiente de endotelio a Ach en vasos aislados de SHR está mediada por la activación de la COO y de los receptores de  $TXA_2/PGH_2$  (Lüscher y

Vanhoutte 1986; K $\ddot{u}$ ng y L $\ddot{u}$ scher, 1995). La administraci3n de inhibidores de 3sta, como la indometacina, o de antagonistas del receptor PGH $_2$ /TXA $_2$ , no s3lo reducen los niveles de PA (L $\ddot{u}$ scher y cols., 1990; Tesfamariam y Ogletree, 1995; Purkerson y cols., 1986), sino que tambi3n mejoran la relajaci3n y la contracci3n dependientes de endotelio (K $\ddot{u}$ ng y L $\ddot{u}$ scher, 1995; L $\ddot{u}$ scher y cols., 1990; Tesfamariam y Ogletree, 1995; Diederich y cols., 1990). Por ello, se ha propuesto que un EDCF, derivado del 3cido araquid3nico, probablemente la PGH $_2$  y/o el TXA $_2$  estar3a sobreexpresando su acci3n a nivel local antagonizando las acciones del NO. Apoyando esta hip3tesis, se ha observado una mayor producci3n endotelial basal y estimulada del TXA $_2$  en la aorta (Taddei y Vanhoutte, 1993a) y tambi3n en el ri3n3n (Konieczkowski y cols., 1983; Purkerson y cols., 1986; Shibouta y cols., 1981) de SHR adultas y j3venes prehipertensas comparado con la WKY. Por otro lado tambi3n se ha sugerido que una producci3n exagerada de radicales libres como los aniones super3xido podr3an ser responsables de la disfunci3n endotelial que presenta la SHR (Tschudi y cols., 1996). La administraci3n de dadores de grupos sulfhidrilo como la N-acetilcisteina o el 3cido tiosalic3tico son capaces de proteger al NO de la oxidaci3n e incrementan la respuesta a la Ach en las SHR (Lahera y cols., 1993). Tambi3n el tratamiento con super3xido dismutasa unida a una prote3na de fusi3n o con un inhibidor de la xantino oxidasa, implicada en la formaci3n de aniones super3xido, disminuye la PA en la SHR pero no en la WKY (Nakazono y cols., 1991). Existen adem3s numerosas evidencias que indican que hay una estimulada inervaci3n simp3tica y un aumento de la respuesta adren3rgica de las arterias musculares de resistencia en la SHR comparado con la WKY (Dohi y cols., 1990), aunque no en la aorta (K $\ddot{u}$ ng y L $\ddot{u}$ scher, 1995), que podr3an contribuir al aumento de las resistencias perif3ricas. Tambi3n existe una mayor respuesta vascular renal a la AII en la SHR respecto a la WKY (Collis y Vanhoutte, 1978; Kost y cols., 1993). De acuerdo con esto, no s3lo se ha observado una mayor densidad de receptores AT $_1$  de AII en el ri3n3n (Song y cols., 1995), sino que tambi3n en arterias mesent3ricas de resistencia se ha encontrado un incremento en la densidad tanto de receptores AT $_1$  como  $\alpha_1$ -adren3rgicos en SHR j3venes prehipertensas que podr3a tener un papel importante en el desarrollo de altas presiones en este modelo experimental (Schiffirin y cols., 1984).

Las alteraciones estructurales asociadas con la hipertensi3n consisten principalmente en una hipertrofia card3aca y vascular (Roman y cols., 1992; Roman y cols., 1995), aunque

las modificaciones de la pared arterial en diferentes modelos de hipertensión varían en función de la especie, el tipo de lecho vascular y la categoría de los vasos (Mulvany y Aalkjaer, 1990). La alteración predominante de las grandes arterias en la hipertensión genética establecida como es el caso de la SHR consiste en una hipertrofia e hiperplasia de las células musculares de la media (Owens, 1987; Owens, 1989). Sin embargo, las arterias de resistencia de pequeño calibre muestran cambios de tipo hiperplásico (Mulvany y Aalkjaer, 1990; Owens y cols., 1988) sin un incremento de la incidencia de hiperplasia de las células musculares (Owens y cols., 1988) y procesos de remodelado vascular (Heagerty y cols., 1993) que conducen a un modesto grado de estrechamiento en los vasos de resistencia. Otra característica de este modelo de hipertensión es que se ha detectado la presencia de hipertrofia e hiperplasia vascular (Olivetti y cols., 1982; Lee y cols., 1987), así como de hipertrofia cardíaca (Gray, 1984) en un estado prehipertensivo. Estas alteraciones en la estructura cardiovascular que presenta la SHR aún antes de que se manifieste la hipertensión, por tanto, podrían estar implicadas no sólo en el mantenimiento de la hipertensión, sino también en su desarrollo. Una incrementada generación de  $TXA_2$  en las células del músculo liso vascular parece ser responsable en parte del incremento en la actividad proliferativa del músculo liso que presenta la SHR respecto a la WKY (Ishimitsu y cols., 1988b). También un incremento de la inervación simpática (Lee y cols., 1987; Scott y Pang, 1983), un aumento de la afinidad y la densidad de receptores  $AT_1$  de AII (Bukenburg y cols., 1992), así como de la actividad del SRA vascular (Asaad y Antonaccio, 1982) o deficiencias de la vía L-arginina-NO (Matsuoka y cols., 1996) podrían contribuir a estas alteraciones en la estructura cardiovascular que presenta la SHR. El tratamiento con inhibidores de la tromboxano sintetasa (Ishimitsu y cols., 1988b; Purkerson y cols., 1986), con antagonistas de los receptores  $AT_1$  o IECAs (Nishimura y cols., 1995), o con L-arginina (Matsuoka y cols., 1996) puede reducir estas alteraciones en la SHR.

### **3.3.- EFECTOS VASCULARES DEL ENVEJECIMIENTO EN LA HIPERTENSION**

El envejecimiento y la hipertensión son conocidos factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Byyny, 1995, Kannel y cols. 1987). Además, estos dos factores generalmente, como ocurre un gran número de veces, se encuentran asociados, sumando sus efectos. La marcada estimulación de las complicaciones vasculares relacionadas

con la edad que existe en la hipertensión sugiere también una importante interacción entre los dos procesos. De esta forma, los procesos normales de la edad parecen afectar al sistema cardiovascular en mayor grado en individuos hipertensos que en normotensos, así como el riesgo de complicaciones cardiovasculares en pacientes hipertensos ancianos es significativamente más alto que en jóvenes con los mismos niveles de PA (Vokonas y cols., 1988).

Los procesos del envejecimiento, además, no sólo afectan a la función vascular en distinto grado en animales normotensos e hipertensos, sino también de diferente forma (Docherty, 1990). Tanto en animales normotensos como hipertensos se ha observado una disminución de la relajación dependiente de endotelio con la edad (Fujii y cols., 1993; Tominaga y cols., 1994; Koga y cols., 1988), aunque en estos últimos este efecto pueda estar agravado por la hipertensión, sin embargo se han encontrado efectos opuestos en la respuesta constrictora dependiente de endotelio (Küng y Lüscher, 1995), en la respuesta a AI (Lang y cols., 1995) y a los análogos del TXA<sub>2</sub> (Küng y Lüscher., 1995; Lang y cols., 1995) entre ratas normotensas e hipertensas durante el envejecimiento. También las alteraciones vasculares funcionales que tienen lugar con la hipertensión y el envejecimiento, aunque son similares, tampoco ocurren siempre en el mismo sentido. Así, mientras que la relajación y la contracción dependientes de endotelio podría ser afectada de forma similar (Fujii y cols., 1993; Koga y cols., 1989, Koga y cols., 1988), las alteraciones de la respuesta vasoconstrictora pueden depender en gran medida del agente vasoconstrictor estudiado. Por otro lado, los cambios en la estructura vascular que ocurren durante el envejecimiento y con la hipertensión son muy semejantes y parecen causar daños sinérgicos en la pared arterial (Haudenschild y cols., 1981; Haudenschild y cols., 1984). La combinación de ambos factores, la edad y la hipertensión, puede por tanto causar un incremento de las alteraciones estructurales del sistema cardiovascular. Por último hay que señalar que aunque están bien establecidas las consecuencias de la hipertensión y algunas de las alteraciones que se producen con la edad, los efectos específicos del envejecimiento en la hipertensión y sus consecuencias vasculares, sin embargo, no se conocen demasiado bien, ya que los estudios realizados hasta el momento son escasos y a menudo contradictorios y dejan numerosos aspectos sin resolver.



## ***OBJETIVOS***

---

- 1.- Estudiar los efectos vasculares del envejecimiento en la SHR.
  
- 2.- Estudiar las consecuencias de la interrupción del SRA con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> de AII y con un inhibidor de la ECA sobre las alteraciones vasculares producidas por el envejecimiento en la SHR.
  
- 3.- Valorar si los efectos inducidos por los fármacos que interfieren con el SRA sobre la función vascular en la SHR son consecuencia de su efecto antihipertensivo o de efectos específicos de los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de AII y de los inhibidores de la ECA.

## ***MATERIALES Y METODOS***

---

## **1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

Se utilizaron SHR machos de dos grupos de diferente edad y por tanto en distinto estadio de evolución de la hipertensión arterial, ratas adultas de 6 meses de edad, y ratas viejas de 24 meses de edad (Charles River, Barcelona, España). La SHR es un apropiado modelo experimental de hipertensión genética para estudiar la hipertensión esencial en el hombre, ya que reproduce muchas de las características de ésta. Como ocurre en la hipertensión esencial, la hipertensión en la SHR se desarrolla espontáneamente, es más severa en machos que en hembras y generalmente está asociada con complicaciones de varios órganos diana incluyendo los vasos sanguíneos, el corazón, el cerebro y el riñón. La utilización de este modelo experimental ofrece además una importante ventaja para estudiar los efectos del envejecimiento, ya que la rata, a diferencia del hombre, no desarrolla aterosclerosis, por lo que los resultados obtenidos en dicho modelo son atribuibles al envejecimiento y a la evolución de la hipertensión y no a alteraciones derivadas del proceso aterosclerótico, que a menudo aparecen asociadas con ambas situaciones y que podrían oscurecer o confundir los resultados de este estudio.

Los animales utilizados en el presente trabajo se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y bajo condiciones controladas de temperatura durante todos los experimentos, teniendo libre acceso al agua y al alimento (dieta estandar, A. 04 Panlab, Barcelona, España). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas de la Unión Europea para el tratamiento ético de los animales de experimentación.

## **2.- METODOLOGIA**

### **2.1.- DETERMINACION DE LA PRESION ARTERIAL SISTOLICA**

Las cifras de PAS se determinaron de forma indirecta, en la cola de los animales, mediante un método pletismográfico (Narco Bio-Systems, Houston, TX, USA). Diez días antes de comenzar el experimento se acostumbró diariamente a los animales al proceso de medida de la PA. Para ello las ratas eran colocadas dentro de sus jaulas en una habitación a 28°C durante 2 horas, transcurrido este tiempo se les medía la PA, sin llegar a

inmovilizarlas totalmente para evitar en lo posible generar condiciones estresantes para los animales. Cuando se consideró que las ratas se habían acostumbrado al proceso de medida, de forma que ello no interfiriera en la valoración correcta de este parámetro, se determinó su PAS. El valor definitivo de la PAS se obtuvo a partir de la toma de ocho medidas sucesivas en cada animal, en dos días consecutivos a la misma hora (11h.) y se calculó la media aritmética correspondiente para cada uno de ellos, rechazándose el valor máximo y mínimo.

### **2.1.1.- Validación del método pletismográfico para la medida de la presión arterial sistólica**

Con objeto de validar el método de medida indirecta de la PAS anteriormente descrito, se comparó con un método de medida directa. Para este fin se utilizó un grupo de animales tomados al azar para cada uno de los grupos de diferente edad ( $n=7$ ) a los que se les implantó un catéter en la arteria femoral. Dos días después de la intervención, los catéteres se conectaron a un transductor de presión (modelo P23XL, Spectromed, Oxnard, CA, USA) que estaba acoplado a un polígrafo (7E, Grass Instruments, Quincy, MA, USA) para registrar directamente la PAS en la rata consciente. Del estudio comparativo de ambos métodos se obtuvo una correlación estadística media de todos los experimentos del  $93 \pm 3$  % entre los valores determinados por medida directa y los obtenidos de forma indirecta.

### **2.2.- DETERMINACION DE LOS NIVELES PLASMATICOS DE NITRATOS Y NITRITOS**

Las muestras de sangre para la determinación de la concentración plasmática de nitratos y nitritos se extrajeron en el animal ligeramente anestesiado con eter etílico, por punción transcutánea a nivel de la clavícula en una de las venas yugulares y utilizando ácido etilen-diamina tetra-acético ó EDTA (Sigma Chemical Co) al 2% para evitar la coagulación de la sangre. Las muestras así obtenidas eran centrifugadas a 1500g y a 2-4°C durante 15 minutos para la separación del plasma, que era recogido y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis.

Para valorar los niveles de nitratos y nitritos en plasma primero se realizó la conversión de los nitratos en nitritos a través de la nitrato reductasa dependiente de NADH para poder determinar la concentración total de nitritos, que se corresponderá por tanto con la concentración de nitratos + nitritos plasmáticos. La concentración total de nitritos en plasma se calculó mediante un método colorimétrico de determinación indirecta basado en una modificación de la reacción de Griess (Green, 1982). El NO liberado se convierte rápidamente en nitratos y nitritos en sangre, por lo que la medida de los nitratos y nitritos plasmáticos se utilizó como un índice indirecto de la producción o disponibilidad de NO.

### **2.3.- REACTIVIDAD VASCULAR**

El día del experimento los animales eran anestesiados mediante la administración de pentobarbital sódico (50 mg/Kg, intraperitoneal) y desangrados antes de proceder a la extracción de la aorta torácica. Una vez aislada, la arteria era colocada en una placa Petri que contenía una solución bicarbonatada de Kreb's oxigenada y fría, de la siguiente composición: NaCl 118.5, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 y glucosa 11.1 (Panreac). Después de lo cual, se eliminaba cuidadosamente el tejido superficial adherido a la adventicia y se seccionaba la arteria transversalmente en segmentos de aproximadamente 3 mm de longitud. Los anillos aórticos se colocaron en baños de órganos que contenían 5 ml de Kreb's a una temperatura de 37°C y se montaron entre dos alambres rígidos de acero (150 μm de diámetro) que se introducían por la luz arterial con cuidado de no producir estiramientos en el vaso, ni dañar el endotelio. Uno de los alambres permanecía fijo a la pared del baño y el otro, paralelo al anterior, estaba conectado a un transductor de fuerza (modelo FT03, Grass) que se encontraba acoplado a un polígrafo (modelo 7E, Grass) con el objeto de registrar los cambios en la tensión isométrica desarrollados (Figura 6). El medio de incubación era continuamente oxigenado con una mezcla gaseosa de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> que proporcionaba un pH final fisiológico entre 7,4 y 7,6.

Los segmentos arteriales se equilibraban a una tensión inicial de 2g, reajustandolos a esta tensión periódicamente y cambiando el medio de incubación cada intervalo de 15 minutos, hasta que transcurrido un periodo de 60-90 minutos los anillos se encontraban estabilizados a dicha tensión basal. En estudios preliminares comprobamos que esta tensión

basal de 2g era la óptima requerida para la expresión de la contracción inducida por cloruro potásico (KCl) en anillos de aorta de SHR. La presencia de un endotelio funcional se comprobaba al final de cada experimento valorando la vasorrelajación inducida por  $10^{-5}$  mol/L de Ach. Todos los anillos que no presentaban respuesta vasodilatadora a Ach eran desechados.

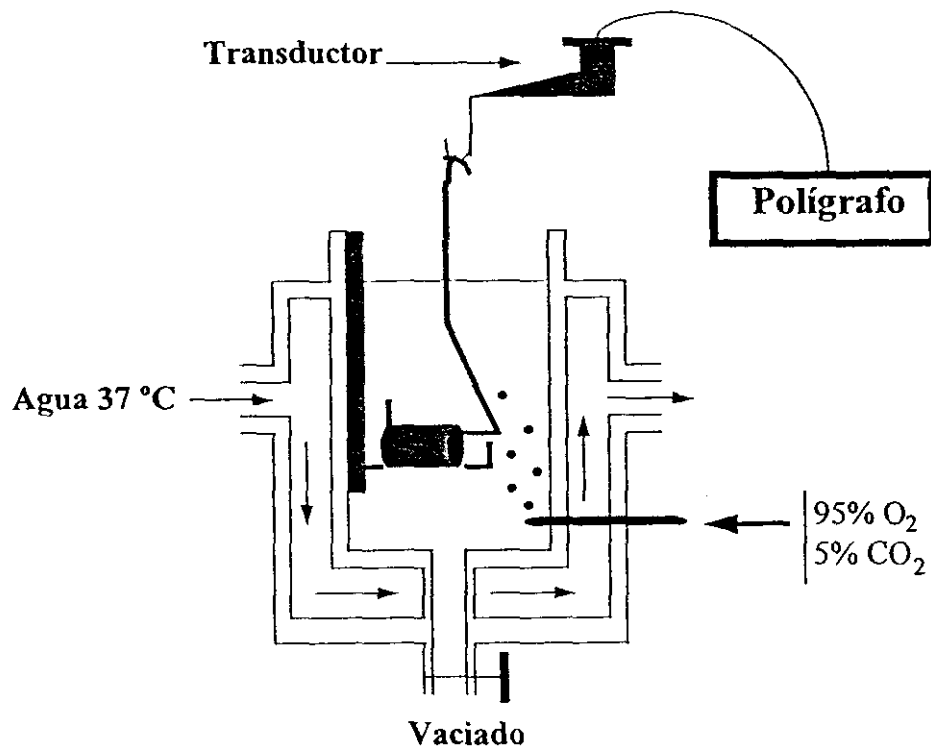


Figura 8.- Esquema de un baño de órganos

### **2.3.1.- Agentes vasoactivos utilizados**

Angiotensina I (Sigma Chemical Co)

Angiotensina II (Sigma Chemical Co)

Clorhidrato de N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginina metil ester (Sigma Chemical Co)

Cloruro de acetilcolina (Sigma Chemical Co)

Cloruro de fenilefrina (Sigma Chemical Co)

Cloruro potásico (Merck)

Endotelina-1 (Sigma Chemical Co)

Nitroprusiato sódico (Sigma Chemical Co)

U46619 (Cascade)

### **2.3.2.- Preparación de las disoluciones**

Todos los fármacos se disolvieron en agua destilada, excepto el U46619 que estaba disuelto en metilacetato a una concentración de (10mg/ml). Las soluciones de partida se prepararon a una concentración inicial de  $10^{-2}$  M y se almacenaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Diariamente se preparaban las diluciones correspondientes en Krebs's a las concentraciones previamente calculadas para un volumen total de 5ml que contenían los baños de órganos, obteniéndose así la concentración molar final que aparece descrita en los distintos apartados del diseño experimental para cada uno de los fármacos.

## **2.4.- DETERMINACION DE LA MASA CARDIACA Y AORTICA**

El peso del corazón era determinado inmediatamente después del sacrificio de los animales. Una vez aislados y limpios los corazones eran pesados en una balanza (modelo Mettler AC 100, Mettler Instrumente AG, Zürich) y los valores obtenidos se expresaron como el peso relativo en g. respecto a 100 g. de peso corporal.

El peso seco de los anillos aórticos se determinó después de dejarlos secar durante al menos 24 horas tras finalizar cada experimento en una microbalanza (modelo Sartorius 708501, PACISA, Madrid). Los valores obtenidos eran expresados en mg. de tejido aórtico



por 10 mm. de longitud, respecto a 100 gr. de peso corporal.

### **3.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.1.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCION VASCULAR, LA PRESION ARTERIAL, LOS NIVELES PLASMATICOS DE NITRATOS Y NITRITOS, Y LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LA SHR**

Este estudio se realizó con el fin de valorar los efectos del envejecimiento sobre la función vascular en la SHR, así mismo se determinó también si existían modificaciones de la PA durante el envejecimiento en estos animales, o si se producían variaciones en el peso corporal o en el peso de órganos diana importantes en la patología de la hipertensión, como el corazón y la aorta, como un índice indirecto de la existencia de hipertrofia cardiovascular (Hayakawa y Raij, 1997; Sventek y cols., 1996). Además se estudió el efecto de la edad sobre los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos en este modelo de hipertensión. Cada uno de estos parámetros fue valorado individualmente en SHR adultas (n=7) de 6 meses de edad y viejas (n=7) de 24 meses de edad.

##### **3.1.1.- Efectos del envejecimiento sobre la reactividad vascular en la SHR**

Para estudiar las modificaciones que se producen en la función vascular con el envejecimiento, se utilizaron anillos de aorta aislados de SHR adultas y viejas, valorando las respuestas a diferentes agentes vasodilatadores y vasoconstrictores, así como la participación del NO derivado del endotelio en dichas respuestas.

###### **3.1.1.1.- Estudio de la respuesta vasoconstrictora**

###### *Respuesta a factores vasoconstrictores no derivados del endotelio*

Se evaluó la contracción inducida por KCl (10-120 mmol/L), cuya acción es independiente de receptor, para valorar si el envejecimiento producía alteraciones en los mecanismos contráctiles generales de las células del músculo liso vascular.

Para determinar el efecto del envejecimiento sobre la respuesta inducida por agentes vasoconstrictores no derivados del endotelio, cuya acción está mediada por receptores específicos, se estudió la respuesta inducida por dos de los vasoconstrictores más importantes con acción sistémica, la AII ( $10^{-7}$  mol/L) y un agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, como la fenilefrina (FE:  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L). En el caso de la AII sólo se valoró su respuesta a una única concentración, ya que en estudios previos observamos que la AII producía un gran efecto taquifiláctico en la aorta de la SHR, haciendo difícil por este motivo la realización de una curva concentración-respuesta. Este efecto taquifiláctico de la AII ha sido ampliamente descrito en la bibliografía tanto en vasos aislados como en estudios *in vivo* en ratas (Kuttan y Sim, 1993a y b; Sim y Radhakrishnan, 1994)

#### *Respuesta a factores vasoconstrictores derivados del endotelio*

Se estudió el efecto del envejecimiento sobre la contracción inducida por agentes vasoconstrictores derivados del endotelio, evaluando la respuesta a concentraciones crecientes y acumulativas de ET-1 ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  mol/L) y de un análogo del  $\text{TXA}_2$ , el U46619 ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L).

Asimismo, se estudió la contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L) en presencia de un inhibidor de la síntesis del NO, LNAME ( $10^{-4}$  mol/L). La respuesta contráctil inducida por la Ach en presencia de LNAME (Ach+LNAME) se realizó con objeto de estudiar la contracción a los EDCFs endógenos. La Ach a elevadas concentraciones además de estimular la liberación de NO,  $\text{PGI}_2$  y EDHF en las células endoteliales, también es capaz de producir la liberación de EDCFs, principalmente de  $\text{TXA}_2$  y/o de  $\text{PGH}_2$ . Para poder estudiar adecuadamente la contracción a dichos agentes es necesario inhibir la síntesis de NO, ya que éste es el principal factor liberado por la Ach en aorta y debido a su acción vasodilatadora puede enmascarar la contracción inducida por éstos (Küng y Lüscher, 1995; Auch-Schwelk y cols., 1992)

**3.1.1.2.- Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora**

Se estudió el papel del NO en la respuesta vasoconstrictora durante el envejecimiento, desarrollando curvas de concentración-respuesta a los siguientes agentes vasoconstrictores después de preincubar los anillos durante 15 minutos en ausencia o presencia del inhibidor de la síntesis de NO, LNAME ( $10^{-4}$  mol/L):

- FE ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L).
- ET-1 ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  mol/L).
- U46619 ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L).

**3.1.1.3.- Estudio de la respuesta vasodilatadora**

*Relajación dependiente de endotelio*

Con objeto de evaluar los efectos del envejecimiento sobre la vasorrelajación dependiente de endotelio, los anillos eran previamente contraídos con FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L) hasta alcanzar una contracción submáxima (entre el 60-70% de la respuesta máxima) y estable, necesaria para realizar las curvas de concentración-respuesta a la Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L).

*Relajación independiente de endotelio*

También se determinó el efecto del envejecimiento sobre la relajación independiente de endotelio en anillos aórticos precontraídos con FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L) a una contracción adecuada, submáxima y estable, a partir de la cual se desarrolló la respuesta vasodilatadora a NPS ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L).

### **3.2.- CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LOS EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCION VASCULAR, LA PRESION ARTERIAL, LOS NIVELES PLASMATICOS DE NITRATOS Y NITRITOS, Y LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LA SHR:**

Este estudio fue diseñado para valorar las consecuencias del bloqueo del SRA sobre las alteraciones vasculares producidas por el envejecimiento en la SHR. Para ello se utilizaron dos fármacos que interfieren con este sistema hormonal, pero cuyo mecanismo de acción es diferente al afectar a dos puntos distintos de la cascada del SRA; bien mediante la inhibición de la formación de la AII a través de la ECA, con un IECA como Captopril (Sigma Chemical Co), o bien inhibiendo sus acciones a nivel de receptor con un antagonista específico de los receptores AT<sub>1</sub> de AII, Losartán (Merck). Con objeto de dilucidar si los efectos del tratamiento antihipertensivo con dichos fármacos sobre la reactividad vascular se deben a la disminución de las cifras de PA que éstos producen y/o a los efectos directos derivados de la inhibición de la AII, el estudio se realizó a dos niveles:

1)- Evaluando las acciones vasculares del tratamiento crónico antihipertensivo con Losartán y Captopril. Para ello se utilizaron SHR machos de 3 meses de edad, donde la hipertensión arterial ya estaba establecida, y ratas de 21 meses de edad. Ambos grupos se dividieron a su vez en tres subgrupos distintos dependiendo del tratamiento que recibió cada uno de ellos: Losartán (10 mg/Kg/día) (n=7), Captopril (60 mg/Kg/día) (n=7) y un tercer subgrupo de animales (n=7) que no recibió ningún tipo de tratamiento y se utilizó como control de los anteriores. La elección de las dosis de ambos fármacos se hizo a partir de estudios previos donde se había comprobado que éstas producían un descenso similar de la PA en la SHR. Los tratamientos se administraron disueltos en el agua de bebida durante doce semanas hasta que los animales alcanzaron la edad de 6 y 24 meses, en el caso de las ratas adultas y viejas respectivamente, transcurrido este tiempo fueron sacrificados para la realización de los experimentos *ex vivo*.

En esta primera parte del estudio también se valoró el efecto del tratamiento con Losartán y Captopril durante doce semanas sobre la hipertensión arterial, el peso corporal, el peso de los anillos aórticos y el corazón, así como sobre la concentración de nitratos y

nitritos plasmática. Tanto la PAS como el peso corporal se determinaron basalmente y cada 2 semanas hasta finalizar el estudio, el peso de los órganos y la determinación de los niveles de nitratos y nitritos en plasma se obtuvieron tras sacrificar a los animales, una vez transcurridas las doce semanas de tratamiento.

2)- Evaluando el efecto de la exposición directa de los segmentos arteriales aislados a dichos fármacos. Para este fin se utilizaron SHR machos adultos de 6 meses de edad (n=21) y viejas de 24 meses (n=21) y se valoraron los efectos de la presencia de Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) en el medio de incubación de los anillos aórticos, comparando sus acciones sobre la reactividad vascular y su capacidad para mejorar las respuestas vasculares alteradas por el envejecimiento, sin que puedan interferir en esta acción sus efectos hemodinámicos.

Las concentraciones de Losartán y Captopril utilizadas en este estudio se eligieron en base a su efectividad para inhibir la respuesta a AII y AI respectivamente. La capacidad de Losartán a la concentración empleada para bloquear los receptores AT1 de AII se comprobó en estudios preliminares, demostrando que anulaba totalmente la respuesta constrictora a AII (50 nmol) al ser añadido al medio de incubación de los anillos aórticos. La eficacia de Captopril, a la misma concentración, para inhibir la formación de AII se determinó comprobando que la respuesta constrictora a AI (50 nmol) era bloqueada cuando se añadía Captopril al medio de incubación.

### **3.2.1.- Consecuencias del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas**

Se valoró el efecto del tratamiento continuado con Losartán y Captopril durante doce semanas sobre la reactividad vascular a distintos agentes vasoconstrictores y vasodilatadores en la aorta de SHR adultas y viejas, y si este tratamiento era capaz de prevenir la disfunción vascular causada por el envejecimiento. También se evaluó la participación del NO en la respuesta vasoconstrictora tras el tratamiento crónico con ambos fármacos.

### **3.2.1.1.- Estudio de la respuesta vasoconstrictora**

#### *Respuesta a factores vasoconstrictores no derivados del endotelio*

Se estudió el efecto del tratamiento crónico con Losartán, o Captopril, sobre la respuesta contráctil inducida por KCl (10-120 mmol/L), evaluando si éstos fármacos tenían alguna acción sobre los mecanismos contráctiles generales de las células del músculo liso vascular.

Se valoró la contracción inducida por la AII ( $10^{-7}$  mol/L) y la FE ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L) para determinar si estaba alterada su respuesta tras el tratamiento continuado con un antagonista de los receptores  $AT_1$  de AII o con un IECA.

#### *Respuesta a factores vasoconstrictores derivados del endotelio*

Se evaluó el efecto del tratamiento crónico con Losartán, y Captopril, sobre la contracción inducida por la ET-1 ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  mol/L) y el análogo del  $TXA_2$ , U46619 ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L), así como sobre la vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por la Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L) + LNAME ( $10^{-4}$  mol/L).

### **3.2.1.2.- Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora**

Con objeto de estudiar el papel del NO durante el tratamiento crónico con Losartán, y Captopril, sobre la respuesta vasoconstrictora, se realizaron curvas de concentración-respuesta a los vasoconstrictores ensayados anteriormente: FE, ET-1 y U46619, empleando el mismo rango de concentraciones, después de preincubar los anillos durante 15 minutos en ausencia o presencia de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L):

### **3.2.1.3.- Estudio de la respuesta vasodilatadora**

#### *Relajación dependiente de endotelio*

Para determinar el efecto del tratamiento prolongado con Losartán, y Captopril, sobre la relajación dependiente de endotelio, los anillos eran precontractados con FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L) para estudiar la respuesta vasodilatadora a la Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L).

#### *Relajación independiente de endotelio*

Asimismo, el efecto del tratamiento crónico con Losartán, y Captopril, sobre la vasorrelajación independiente de endotelio, se estudió valorando la respuesta a NPS ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L) en los anillos aórticos precontractados con FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L).

### **3.2.2.- Consecuencias de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la reactividad vascular en las SHR adultas y viejas**

Se evaluaron los efectos directos de Losartán y Captopril al ser añadidos al medio de incubación de los anillos aórticos aislados de SHR adultas y viejas, estudiando la respuesta vasodilatadora y vasoconstrictora y el papel que juega el NO en las acciones vasculares de ambos fármacos sobre la respuesta constrictora; así como para comprobar si los efectos observados durante el tratamiento crónico eran reproducibles con la presencia de los fármacos en el medio de incubación.

Para estudiar los efectos de Losartán y Captopril sobre la reactividad vascular primero fue necesario determinar si éstos tenían alguna acción sobre el tono aórtico basal o si eran capaces de inducir vasorrelajación por sí mismos. Por ello, un primer grupo de experimentos fueron diseñados para determinar el efecto de concentraciones crecientes y acumulativas de Losartán ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L) sobre el tono basal de los anillos aórticos y sobre la tensión isométrica de anillos contractados previamente con una dosis submáxima de FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L).

### **3.2.2.1.- Estudio de la respuesta vasoconstrictora**

#### *Respuesta a factores vasoconstrictores no derivados del endotelio*

Se valoró el efecto de la preincubación de los anillos aórticos durante 15 minutos en presencia o ausencia de Losartán, o Captopril, sobre la respuesta inducida por KCl (10-120 mmol/L).

Se estudió el efecto de la inhibición de la ECA, o del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>, sobre la contracción inducida por la AII (10<sup>-7</sup> mol/L) y la FE (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> mol/L) preincubando los anillos durante 15 minutos en presencia o ausencia de Captopril y Losartán respectivamente.

#### *Respuesta a factores vasoconstrictores derivados del endotelio*

Para determinar el efecto de Losartán y Captopril sobre la respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores derivados del endotelio, se preincubaron los anillos aórticos en presencia o ausencia de Losartán, o Captopril, durante 15 minutos antes de realizar las curvas de concentración-respuesta a la ET-1 (10<sup>-10</sup>-10<sup>-7</sup> mol/L), al U46619 (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> mol/L) y a la Ach (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> mol/L) + LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L).

### **3.2.2.2.- Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora**

Se estudió el efecto de la adición de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L) al medio de incubación sobre la respuesta constrictora de los anillos aórticos preincubados durante 15 minutos en ausencia o presencia de Losartán, o Captopril, a los mismos agentes, FE, ET-1 y U46619, y a las mismas concentraciones ensayadas en los anteriores protocolos.



### **3.2.2.3.- Estudio de la respuesta vasodilatadora**

#### *Relajación dependiente de endotelio*

Se evaluó el efecto directo de la inhibición de la ECA y del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> de AII sobre la vasorrelajación dependiente de endotelio, preincubando los anillos aórticos con Captopril, o Losartán, respectivamente, durante 15 minutos antes de precontraerlos con FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L) y estudiar la respuesta a Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L).

#### *Relajación independiente de endotelio*

El efecto directo de Losartán y Captopril sobre la relajación independiente de endotelio se determinó también valorando la respuesta a NPS ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L) en los anillos preincubados durante 15 minutos en ausencia o presencia de uno u otro fármaco y precontraídos con FE ( $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L).

## **4.- ANALISIS ESTADISTICO**

Tanto en los estudios realizados en el animal como la PAS y el peso corporal, como en los estudios del peso de los órganos y las concentraciones plasmáticas de nitratos y nitritos, todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estandar de la media (eem), siendo *n* el número de animales utilizados en cada experimento. Para comparar los cambios en la evolución de un parámetro como ocurre en el caso de la PAS y el peso corporal dentro de un mismo grupo se hizo un test "t" de Student pareado. Las comparaciones estadísticas de los distintos parámetros estudiados entre grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza de doble vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de medias *a posteriori* (test Newman-Keuls), cuando se encontraron diferencias. La hipótesis nula era rechazada cuando el valor de *p* era menor que 0.05.

Para el estudio de la reactividad vascular los resultados obtenidos con los agentes vasoconstrictores eran determinados como cambios en la tensión isométrica inducidos por los distintos agentes y normalizados por el peso seco de los anillos vasculares en el caso de

la respuesta inducida por KCl y expresados como porcentaje respecto de la contracción a KCl (120 mM) para el resto de los vasoconstrictores. La respuesta obtenida por los agentes vasodilatadores era expresada como el porcentaje de reducción de la tensión isométrica respecto a la precontracción alcanzada. La concentración de KCl y el logaritmo negativo de la concentración de FE, ET-1, U46619, Ach y NPS, que producían el 50% de la respuesta máxima ( $ED_{50}$  y  $pD_2$  respectivamente), así como la respuesta máxima se determinó a partir de las curvas de concentración-respuesta individuales por un análisis de la regresión lineal y por el ajuste a una curva hiperbólica respectivamente, mediante el programa Scientific Parameter Fitter (Fig P. Software Corporation, Durham, North Caroline, USA). Todos los resultados se expresaron como media  $\pm$  eem, de los anillos procedentes de 7 animales diferentes. Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de dos vías para múltiples comparaciones, seguido por un test de Newman-Keul cuando fue necesario. Como en el caso anterior la hipótesis nula también era rechazada cuando el valor de p era menor que 0.05.

La elaboración de todas las pruebas estadísticas se realizó con el apoyo informático del paquete estadístico CSS (Tulsa, OK, EEUU).

## *RESULTADOS*

---

## **1.- EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

### **1.1.- EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN LA SHR**

Los valores de PAS fueron similares en las SHR adultas y viejas (Tabla 1), lo que parece indicar que el envejecimiento no modifica significativamente las cifras de PAS en la SHR, una vez que la hipertensión arterial se ha estabilizado en el animal adulto.

### **1.2.- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

El tratamiento crónico con Losartán en el agua de bebida durante doce semanas, tanto en las SHR adultas como en las viejas, produjo una clara disminución de los valores de PAS respecto a sus valores basales y respecto a los valores obtenidos en los animales sin tratamiento en el mismo tiempo de evolución (Tabla 1). Esto indicaría que el efecto de Losartán sobre la PAS en la SHR es independiente de la edad.

La administración crónica de Captopril en el agua de bebida también produjo una reducción significativa en las cifras de PAS en las ratas adultas y viejas en la doceava semana de tratamiento, frente a sus valores iniciales, y a los de sus respectivos controles (Tabla 1) sugiriendo como en el caso del antagonista de los receptores  $AT_1$ , que el efecto antihipertensivo de Captopril no depende de la edad de los animales. Además, la efectividad antihipertensiva de ambos tratamientos a las dosis utilizadas fue similar, ya que la disminución de la PAS observada con Captopril fue semejante a la que se obtuvo con Losartán en ambos grupos de animales.

## **2.- EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE NITRATOS Y NITRITOS EN LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

### **2.1- EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE NITRATOS Y NITRITOS EN LA SHR**

La concentración de nitratos y nitritos en plasma fue similar en las SHR adultas y viejas (Tabla 1). Este parámetro representa un índice indirecto de la producción de NO, por lo que estos resultados parecen sugerir que no habría grandes modificaciones de la producción de NO durante el envejecimiento en estos animales.

### **2.2- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE NITRATOS Y NITRITOS EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

Las SHR adultas y viejas tratadas con Losartán o Captopril durante doce semanas presentaron un incremento considerable de las concentraciones nitratos y nitritos plasmáticos comparado con sus respectivos controles sin tratamiento (Tabla 1), lo que sugiere que la administración crónica de estos fármacos que interfieren con el SRA podría producir un aumento de la producción o disponibilidad de NO en la SHR.

## **3.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

### **3.1- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LA SHR**

El peso corporal fue ligeramente menor en las SHR viejas que en las adultas, mientras que el peso relativo del corazón y de los anillos aórticos fue significativamente mayor en las ratas viejas que en las adultas (Tabla 2). Estos datos indican que el

envejecimiento está asociado con una hipertrofia cardíaca y aórtica en estos animales.

### **3.2.- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

No se observaron variaciones del peso corporal durante el tratamiento crónico con Losartán, o Captopril, en las SHR viejas ni en las adultas. Sin embargo, los dos tratamientos disminuyeron la masa cardíaca y el peso relativo de los anillos aórticos en ambos grupos de edad, alcanzándose en las ratas viejas valores comparables a los obtenidos en las adultas sin tratamiento (Tabla 2). Esto sugiere que el tratamiento con fármacos que inhiben crónicamente el SRA disminuye la masa cardíaca y vascular en este modelo de hipertensión y previene la hipertrofia cardiovascular que se produce con el envejecimiento.

### **4.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

#### **4.1.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LA SHR**

##### **4.1.1.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio**

##### ***Respuesta contráctil a KCl***

El incremento en la tensión isométrica inducido por la despolarización de las células del músculo liso con KCl fue menor en los anillos aórticos de las SHR viejas que en las adultas (Tabla 3 y 4), indicando que el envejecimiento está asociado con una pérdida de la capacidad contráctil del músculo liso vascular en estos animales.

### ***Respuesta contráctil a AII***

En los anillos aórticos de las SHR viejas la contracción a AII estaba incrementada respecto a las adultas (Figura 9), lo que parece indicar que existe una mayor respuesta a la AII con la edad en este modelo de hipertensión.

### ***Respuesta contráctil a FE***

La respuesta máxima desarrollada por la FE en los anillos aórticos de las ratas de 24 meses de edad fue significativamente mayor que en las ratas de 6 meses (Figura 10). Sin embargo, los valores de  $pD_2$  fueron similares en ambos grupos de animales (Tabla 5). Estas diferencias en la contracción máxima sugieren que el envejecimiento también potencia la respuesta a este agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico en la SHR.

### **4.1.2.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores derivados del endotelio**

#### ***Respuesta contráctil a ET-1***

La contracción inducida por la ET-1 en anillos aórticos de las SHR viejas se encontraba drásticamente reducida respecto a la obtenida en las adultas, tanto en su respuesta máxima, como en los valores de  $pD_2$  (Figura 11, panel superior izquierda; Tabla 5). Esto sugiere que el envejecimiento está asociado con una disminución de la respuesta constrictora a ET-1 en la SHR.

#### ***Respuesta contráctil a U46619***

La curva de concentración-respuesta inducida por el análogo del  $TXA_2$ , el U46619, aparece desplazada hacia la derecha en los animales de 24 meses de edad cuando se compara con la de las ratas de 6 meses (Figura 11, panel superior derecha) y este efecto se acompañaba de una disminución de los valores de  $pD_2$  en los anillos aórticos de las ratas viejas (Tabla 5), indicando que parece existir una menor sensibilidad al U46619 en la aorta

de la SHR con la edad.

#### ***Respuesta contráctil a Ach+LNAME***

La respuesta contráctil inducida por la Ach+LNAME estaba reducida en los anillos aórticos de las ratas viejas respecto a las adultas (Figura 11, panel inferior centro). Estos datos, junto con los anteriores, parecen indicar que en la SHR existe una menor respuesta a los factores vasoconstrictores derivados del endotelio con el envejecimiento.

#### **4.1.3.- Efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora en el envejecimiento**

#### ***Respuesta contráctil a FE***

La presencia del inhibidor de la síntesis de NO, LNAME, en el medio de incubación no modificó el tono basal de los anillos aórticos, pero incrementó la contracción máxima a FE y aumentó los valores de  $pD_2$ , de forma semejante en las SHR adultas y viejas, produciendo un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a FE (Figura 12; Tabla 5). Esto demuestra que existe una mayor sensibilidad a la FE cuando se encuentra inhibido el NO y que este efecto parece ser independiente de la edad de los animales.

#### ***Respuesta contráctil a ET-1***

Los anillos aórticos expuestos al LNAME también presentaban un aumento de la contracción máxima a ET-1, que fue proporcionalmente comparable en las SHR adultas y viejas, observándose también en ambos grupos un incremento significativo en los valores de  $pD_2$  respecto a los anillos que no habían sido pretratados con LNAME (Figura 13; Tabla 5). Estos datos indican que la inhibición del NO también potencia la acción vasoconstrictora de la ET-1 y que este efecto no parece verse modificado con el envejecimiento.



### ***Respuesta contráctil a U46619***

La adición de LNAME al medio de incubación de los anillos aórticos no modificó la respuesta contráctil inducida por el análogo del TXA<sub>2</sub>, el U46619, en las ratas adultas ni en las viejas (Figura 14) y tampoco hubo variaciones significativas en los valores de pD<sub>2</sub> (Tabla 5), sugiriendo que el NO no parece desempeñar un papel regulador importante en la vasoconstricción inducida por el U46619 en anillos de aorta de SHR.

### **4.1.4.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta vasodilatadora**

#### ***Respuesta relajante dependiente de endotelio a Ach***

La relajación máxima inducida por la Ach en anillos aórticos de SHR viejas fue sensiblemente menor que en las adultas, sin variaciones significativas en los valores de pD<sub>2</sub> (Figura 15, panel superior; Tabla 6), indicando que la edad disminuye la relajación dependiente de endotelio a la Ach.

#### ***Respuesta relajante independiente de endotelio a NPS***

La respuesta vasodilatadora a NPS en anillos aórticos también fue menor en las SHR viejas que en las adultas, con una disminución no sólo de la relajación máxima, sino también de los valores de pD<sub>2</sub> (Figura 15, panel inferior; Tabla 6). Estos datos sugieren que la capacidad del músculo liso de responder a un dador exógeno de NO está empeorada con el envejecimiento.

## **4.2.- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

### **4.2.1.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio**

#### ***Respuesta contráctil a KCl***

El tratamiento crónico con Losartán o Captopril en la SHR durante doce semanas no modificó la respuesta vasoconstrictora de los anillos aórticos a KCl respecto al grupo control, que no recibió ningún tratamiento, ni en los animales de 6 meses ni en los de 24 meses de edad (Tabla 3). Esto indicaría que ninguno de los dos tratamientos parece afectar a los mecanismos que median el proceso de contracción en las células del músculo liso vascular.

#### ***Respuesta contráctil a AII***

La administración crónica de Losartán disminuyó significativamente la contracción inducida por la AII en anillos de aorta, respecto a la respuesta obtenida en los animales que no recibieron tratamiento, tanto en las SHR adultas como en las viejas, aunque en este último grupo el efecto de Losartán fue significativamente mayor (Figura 16). Según estos resultados el bloqueo continuado de los receptores AT<sub>1</sub> atenua la contracción a AII, siendo mayor su efectividad cuando esta respuesta está aumentada como ocurre en las ratas viejas.

La contracción inducida por AII en anillos de aorta de SHR adultas tratadas crónicamente con Captopril fue significativamente más elevada que la obtenida en el grupo control, pero no en las ratas viejas tratadas con Captopril, cuya respuesta a AII fue semejante a la observada en los animales sin tratamiento de la misma edad (Figura 16). Este hecho parece indicar que el tratamiento crónico con un IECA en las SHR adultas produce una respuesta exagerada a la AII, que no se manifiesta en las ratas viejas donde su respuesta a AII ya estaba incrementada.

### ***Respuesta contráctil a FE***

La vasoconstricción inducida por la FE en los anillos aórticos de las SHR adultas fue similar tanto en los animales tratados crónicamente con Losartán, o con Captopril, como en el grupo control (Figura 17, panel superior; Tabla 7). Sin embargo, la respuesta a FE fue menor en los anillos aórticos de las ratas viejas tratadas con Losartán, aunque no con Captopril, que en el grupo control sin tratamiento (Figura 17, panel inferior; Tabla 8). De ello se deduce que ni el bloqueo continuado de los receptores AT<sub>1</sub>, ni la inhibición crónica de la ECA, tienen efecto sobre la respuesta contráctil inducida por la FE en la aorta de SHR adultas, y sólo el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> previene la elevada respuesta a FE que presentan las ratas viejas.

#### **4.2.2.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores derivados del endotelio**

### ***Respuesta contráctil a ET-1***

Las curvas de concentración-respuesta inducidas por la ET-1, así como sus valores de pD<sub>2</sub>, fueron semejantes para todos los grupos estudiados en el caso de las ratas adultas (Figura 18, panel superior; Tabla 7). Sin embargo, en las ratas viejas ambos tratamientos aumentaron ligeramente la contracción máxima a ET-1, sin modificar los valores de pD<sub>2</sub>, (Figura 18, panel inferior; Tabla 8). Estos resultados sugieren que la inhibición de las acciones del SRA a través de estos fármacos de forma crónica, no parece alterar la respuesta contráctil inducida por la ET-1 en anillos aórticos de SHR adultas, pero mejoran la reducida respuesta que presentaban las ratas viejas.

### ***Respuesta contráctil a U46619***

La contracción inducida por la adición de dosis crecientes y acumulativas del U46619 no se vió modificada ni en su respuesta máxima ni en los valores de pD<sub>2</sub>, con ninguno de los dos tratamientos administrados crónicamente tanto en las ratas adultas como en las viejas (Figura 19; Tabla 7 y 8). Esto indicaría que ni el tratamiento crónico con Losartán ni con

Captopril tienen efecto sobre la contracción inducida por el U46619 ya sea en SHR adultas o viejas.

#### ***Respuesta contráctil a Ach+LNAME***

En las ratas adultas tratadas crónicamente con Losartán o con Captopril se observó una reducción significativa de la contracción a Ach+LNAME respecto al grupo control, pero no en las viejas cuya respuesta fue similar en todos los grupos estudiados (Figura 20). Esto parece indicar que la inhibición crónica de la formación o de las acciones de la AII disminuye la contracción a los EDCFs en la rata adulta, mientras que en las ratas viejas, donde la contracción a la Ach se encontraba atenuada, el tratamiento no tiene una acción relevante.

#### **4.2.3.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasoconstrictora**

#### ***Respuesta contráctil a FE***

La preincubación de los anillos con LNAME aumentó la respuesta máxima a FE y los valores de  $pD_2$  de forma comparable, en todos los grupos estudiados tanto en las ratas adultas (Tabla 7) como en las viejas (Tabla 8). Esto implica que la administración prolongada de un antagonista de los receptores  $AT_1$  o la de un IECA, no modifica el efecto del LNAME sobre la contracción a FE en los anillos aórticos de estos animales.

#### ***Respuesta contráctil a ET-1***

Los anillos expuestos al LNAME también presentaban un aumento de la respuesta contráctil a ET-1 y de los valores de  $pD_2$  proporcionalmente similar en todos los grupos estudiados (Tabla 7 y 8), indicando que ninguno de los dos tratamientos potencia el efecto del LNAME sobre la contracción a ET-1, en las SHR adultas ni en las viejas.

### ***Respuesta contráctil a U46619***

la adición de LNAME en el medio de incubación de los anillos aórticos no alteró significativamente la contracción inducida por el U46619 cuando las ratas habían sido tratados crónicamente con Losartán, o Captopril, ya fueran adultas (Tabla 7) o viejas (Tabla 8). Estos resultados sugieren que el NO tampoco parece tener una acción relevante en la respuesta constrictora inducida por el U46619, cuando los animales son tratados con cualquiera de los dos fármacos.

### **4.2.4.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasodilatadora**

#### ***Respuesta relajante dependiente de endotelio a Ach***

La relajación máxima inducida por la Ach estaba incrementada en los animales tratados crónicamente con Losartán o con Captopril respecto a la respuesta observada en el grupo control, independientemente de la edad de los animales (Figura 21). Además ambos tratamientos consiguieron mejorar la reducida respuesta a Ach en las ratas viejas, obteniéndose una respuesta comparable a la que presentaron las ratas adultas sin tratamiento (Figura 21). Todo ello sugiere que el tratamiento con fármacos que bloquean el SRA potencia la respuesta inducida por la Ach en las SHR adultas y previene el efecto de la edad sobre la relajación dependiente de endotelio a este vasodilatador en las ratas viejas.

#### ***Respuesta relajante independiente de endotelio a NPS***

La respuesta vasodilatadora independiente de endotelio a NPS no se vió modificada por ninguno de los tratamientos en las SHR adultas, siendo similar para todos los grupos estudiados (Figura 22, panel superior; Tabla 9). Sin embargo, tanto la relajación máxima como los valores de  $pD_2$  para el NPS, se encontraban incrementados en las ratas viejas tratadas con Losartán, o con Captopril, respecto a su grupo control (Figura 22, panel inferior; Tabla 9). Esto indicaría que dichos tratamientos normalizan la disminuida capacidad de respuesta del músculo liso vascular al NPS que se produce con la edad en la SHR.

### **4.3.- CONSECUENCIAS DE LA PRESENCIA DE LOSARTAN Y CAPTOPRIL EN EL MEDIO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

#### **4.3.1.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre el tono aórtico basal y precontraído con FE**

##### ***Efecto sobre el tono aórtico basal***

La presencia de Losartán en el medio de incubación a las concentraciones utilizadas, no fue capaz de modificar el tono basal de los anillos de aorta en ninguno de los dos grupos de edad (adultas:  $0.02 \pm 0.01$  vs  $0.05 \pm 0.03$  y viejas:  $0.03 \pm 0.02$  vs  $0.04 \pm 0.01$  g. de tensión/ mg. de tejido), lo que sugiere que el tono basal en estas condiciones no depende de los receptores AT1. Asimismo, la adicción de concentraciones crecientes de Captopril al medio de incubación, al igual que ocurrió con Losartán, no alteró el tono basal de los anillos aórticos (adultas:  $0.04 \pm 0.01$  vs  $0.02 \pm 0.005$  y viejas:  $0.06 \pm 0.04$  vs  $0.03 \pm 0.01$  g. de tensión/ mg. de tejido), indicando también que la inhibición de la ECA no afecta al tono aórtico basal en la SHR.

##### ***Efecto sobre el tono aórtico precontraído con FE***

La adición de concentraciones crecientes y acumulativas de Losartán no produjo variaciones significativas en la tensión isométrica de los anillos precontraídos con FE, en las ratas adultas ( $1.23 \pm 0.1$  vs  $1.18 \pm 0.12$  g. de tensión/ mg. de tejido) ni en las viejas ( $1.27 \pm 0.2$  vs  $1.22 \pm 0.14$  g. de tensión/ mg. de tejido), sugiriendo que el bloqueo de los receptores AT1 no tiene acción vasodilatadora por sí sólo en anillos aórticos de SHR. Captopril, en el mismo rango de concentraciones que Losartán, tampoco redujo la tensión isométrica a la que se encontraban precontraídos los anillos aórticos de las ratas adultas ( $1.3 \pm 0.2$  vs  $1.24 \pm 0.16$  g. de tensión/ mg. de tejido) y viejas ( $1.25 \pm 0.16$  vs  $1.21 \pm 0.15$  g. de tensión/ mg. de tejido), por lo que parece que la inhibición de la ECA no produce ningún efecto vasorrelajante en aorta aislada de SHR.

#### **4.3.2.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio**

##### ***Respuesta contráctil a KCl***

La respuesta a KCl fue similar en los anillos incubados en presencia o en ausencia de Losartán, o Captopril, tanto en las ratas adultas como en las viejas (Tabla 4). Esto sugiere que ninguno de los dos fármacos parece afectar a los mecanismos implicados en el proceso de contracción que tiene lugar en las células del músculo liso vascular.

##### ***Respuesta contráctil a AII***

La adición de Losartán al medio de incubación de los anillos aórticos anuló la respuesta a AII tanto en las SHR adultas como en las viejas (Figura 23), indicando que la respuesta vasoconstrictora inducida por la AII está mediada por los receptores AT<sub>1</sub>.

La contracción inducida por la AII en los anillos aórticos expuestos a Captopril fue semejante a la observada en los anillos sin Captopril en ambos grupos de edad (Figura 23). Estos datos sugieren que la inhibición directa de la ECA no afecta a la respuesta de la AII en la aorta de SHR.

##### ***Respuesta contráctil a FE***

La presencia de Losartán en el medio de incubación redujo la contracción máxima a FE en las ratas adultas y en las viejas de forma similar (Figura 24). Esta disminución de la contracción máxima inducida por Losartán no se vió acompañada de diferencias en los valores de pD<sub>2</sub> (Tabla 11 y 12). La adición de Captopril al medio, sin embargo, no modificó la respuesta contráctil a FE en las ratas adultas ni en las viejas (Figura 24; Tabla 11 y 12). Estas diferencias observadas en presencia de Losartán y de Captopril sugieren que la inhibición de las acciones de la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub>, pero no de su formación a través de la ECA, atenúa la contracción a FE en la aorta de SHR y es capaz de normalizar la elevada respuesta a este agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico que se produce con el envejecimiento.

#### **4.3.3.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta contráctil a vasoconstrictores derivados del endotelio**

##### ***Respuesta contráctil a ET-1***

La adición de Losartán en los anillos aórticos de las SHR adultas produjo una disminución de la vasoconstricción a ET-1, reduciendo la respuesta máxima, pero sin que se observaran diferencias significativas en los valores de  $pD_2$ , (Figura 25, panel superior; Tabla 13). En las ratas viejas cuya respuesta a ET-1 estaba disminuida, sin embargo, la presencia de Losartán en el medio no fue capaz de modificar su contracción (Figura 25, panel inferior; Tabla 14). La respuesta inducida por la ET-1 tampoco se vió modificada por la adición de Captopril al medio de incubación de los anillos aórticos de las ratas adultas o viejas (Figura 25; Tabla 13 y 14). Esto implicaría que el bloqueo de los receptores  $AT_1$  de AII, pero no la inhibición de la ECA, también atenua la respuesta contráctil inducida por la ET-1 en la aorta de SHR adultas.

##### ***Respuesta contráctil a U46619***

La preincubación de los anillos aórticos con Losartán produjo un desplazamiento de la curva de concentración-respuesta al U46619 hacia la derecha, sin modificar su respuesta máxima, tanto en las ratas adultas como en las viejas (Figura 26). Asimismo se observó una reducción en los valores de  $pD_2$  en los anillos pretratados con Losartán en ambos grupos experimentales (Tabla 15 y 16). Estos datos sugieren que Losartán disminuye la sensibilidad al análogo del  $TXA_2$  en anillos aórticos de SHR independientemente de la edad de los animales. La contracción máxima desarrollada al U46619, así como los valores de  $pD_2$  fueron comparables en presencia o ausencia de Captopril (Figura 26; Tabla 15 y 16), indicando que la inhibición de la ECA, como en el caso de la FE y la ET-1, tampoco tiene ningún efecto sobre la respuesta contráctil inducida por el U46619 en los anillos aórticos de SHR.



### ***Respuesta contráctil a Ach+LNAME***

La presencia de Losartán atenuó la contracción a la Ach+LNAME en los anillos aórticos de las ratas adultas pero no en las viejas, donde la respuesta contráctil a Ach se encontraba muy disminuida (Figura 27). La contracción máxima inducida por la Ach+LNAME fue semejante en los anillos preincubados con o sin Captopril en ambos grupos de edad (Figura 27). Por tanto, estos resultados indican que la adición de Losartán al medio, a diferencia de Captopril, reduce la contracción a los EDCFs en la aorta de las SHR adultas, aunque carece de efecto en las ratas viejas.

### **4.3.4.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones inducidas por la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasoconstrictora**

#### ***Respuesta contráctil a FE***

La adición de LNAME al medio de incubación revirtió la reducción en la contracción a FE producida por la presencia de Losartán en la aorta de SHR adultas y viejas (Figura 28; Tabla 11 y 12), sugiriendo que el NO estaría participando en el efecto de Losartán sobre la contracción a FE en estos animales.

La contracción máxima a FE y los valores de  $pD_2$ , aumentaron con la adición del LNAME al medio de incubación de forma comparable en los anillos aórticos pretratados con o sin Captopril, en las ratas adultas y viejas (Tabla 11 y 12), indicando que la inhibición de la ECA no modifica el efecto del LNAME sobre la vasoconstricción a FE.

#### ***Respuesta contráctil a ET-1***

La preincubación de los anillos aórticos con LNAME revirtió la disminución de la contracción a ET-1 inducida por la presencia de Losartán en las SHR adultas, pero no en las ratas viejas (Figura 29; Tabla 13 y 14). Estos resultados indicarían que el NO también participaría en el efecto de Losartán atenuando la contracción a ET-1 en las SHR adultas.

La respuesta a ET-1 y los valores de  $pD_2$  de los anillos pretratados con Captopril y en presencia de LNAME también fueron semejantes a los observados para sus controles sólo con LNAME, en las ratas adultas y viejas (Tabla 13 y 14), por lo que parece que Captopril tampoco modifica el incremento en la respuesta contráctil a ET-1 producido por el LNAME.

#### ***Respuesta contráctil al U46619***

La presencia de LNAME en el medio de incubación no modificó la contracción inducida por el U46619, pero revirtió parcialmente el desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta producido por Losartán en los anillos aórticos de las ratas adultas y viejas (Figura 30; Tabla 15 y 16). Este hecho sugiere la participación del NO en el efecto de Losartán disminuyendo la sensibilidad de los anillos aórticos al análogo del  $TXA_2$  en la SHR.

Los anillos pretratados con Captopril desarrollaron una respuesta similar al U46619 en presencia o ausencia de LNAME, sin modificaciones en los valores de  $pD_2$  en ninguno de los 2 grupos de diferente edad (Tabla 15 y 16), sugiriendo que el NO tampoco tiene un papel relevante modulando la contracción al U46619 cuando se encuentra inhibida la ECA.

#### **4.3.5.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasodilatadora**

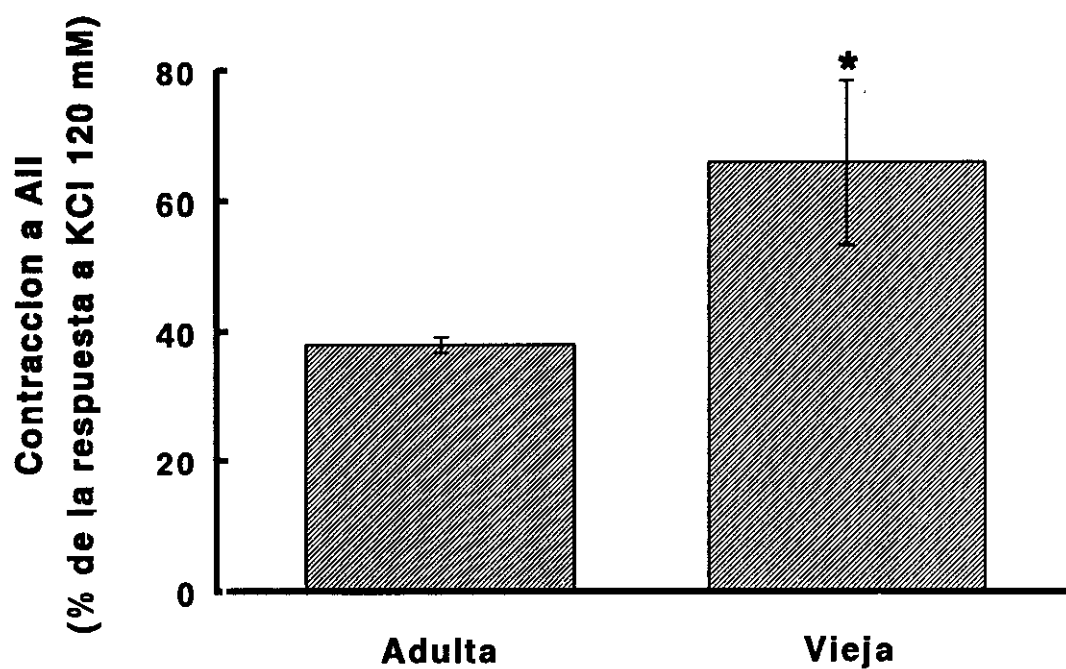
##### ***Respuesta relajante dependiente de endotelio a Ach***

Ni la presencia de Losartán, ni de Captopril, en el medio de incubación de los anillos aórticos, modificó la respuesta vasodilatadora inducida por la Ach en las ratas de 6 meses de edad (Figura 31, panel superior). Sin embargo, en las ratas de 24 meses tanto la preincubación con Losartán como con Captopril aumentó la reducida relajación a Ach que presentaban estos animales, aunque esta respuesta no llegó a ser comparable a la de las ratas adultas (Figura 31, panel inferior). Esto sugeriría que la inhibición de la AII, bien a nivel de su receptor, o bien a nivel de su síntesis a través de la ECA, no tiene efecto sobre la relajación inducida por la Ach en las SHR adultas, sin embargo es capaz de mejorar dicha

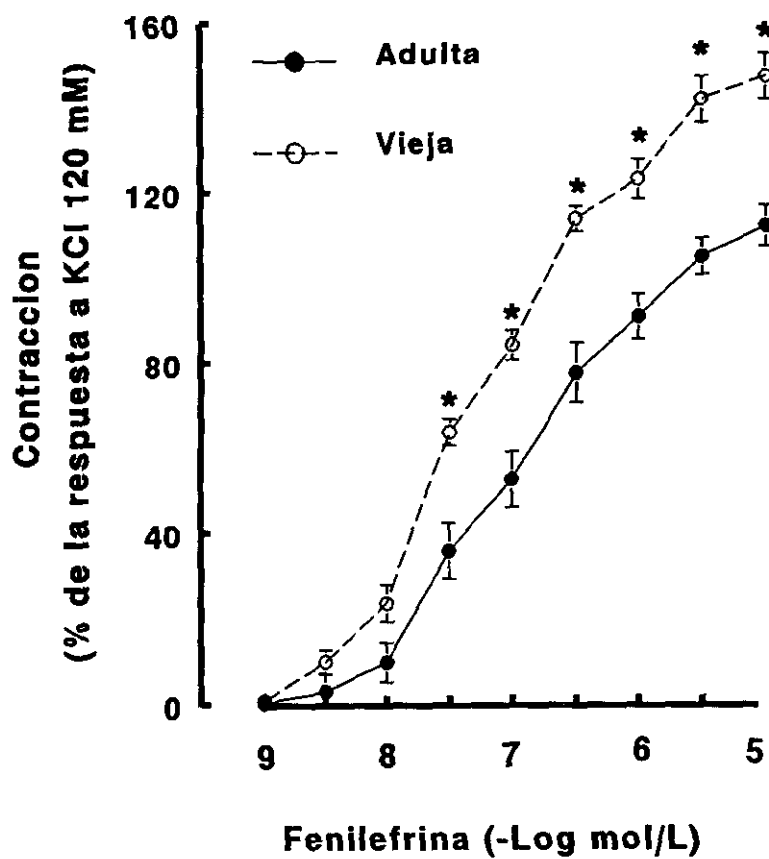
respuesta en las ratas viejas.

***Respuesta relajante independiente de endotelio a NPS***

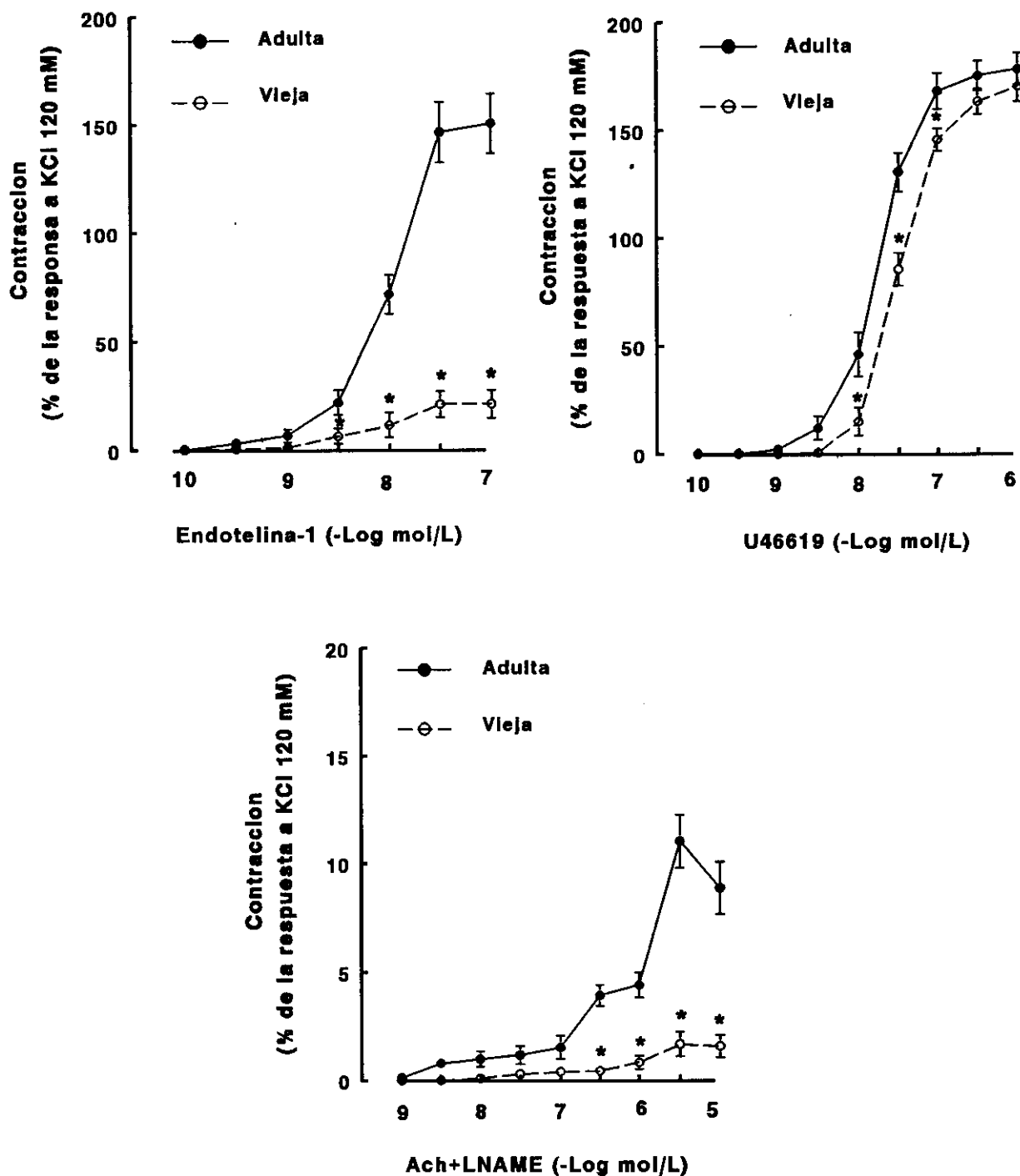
No se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora inducida por el NPS cuando los anillos eran preincubados en presencia o en ausencia de Losartán, o Captopril, en el caso de las ratas adultas, pero ambos fármacos incrementaron la disminuida respuesta a NPS que presentaban las ratas viejas (Figura 32; Tabla 10). Estos resultados indicarían que ni la inhibición de la ECA ni el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> afectan a la relajación del músculo liso vascular a NPS en las ratas adultas, pero mejoran la respuesta del músculo liso a este dador exógeno de NO en las ratas viejas.



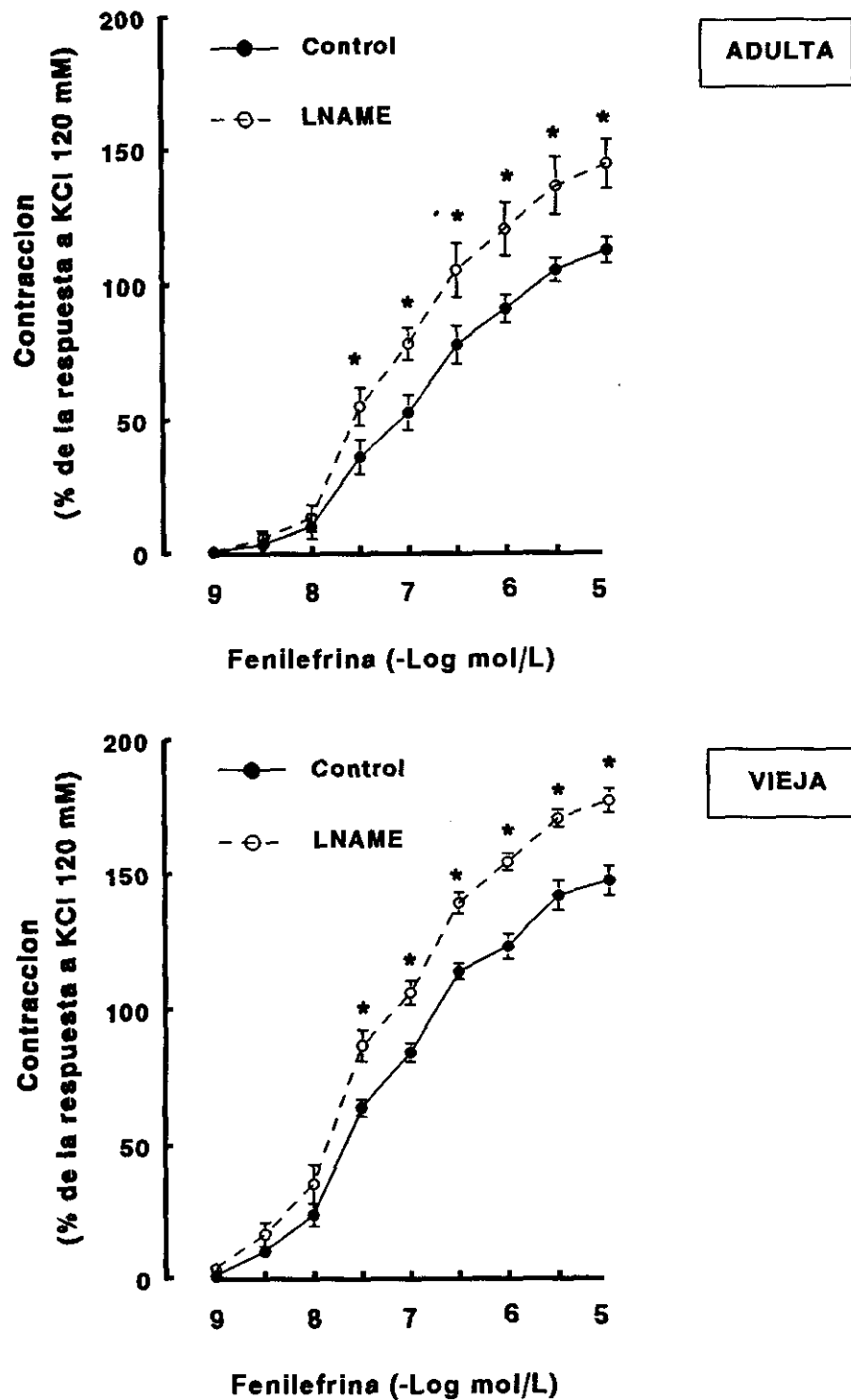
**Figura 9.-** Efecto del envejecimiento sobre la contracción inducida por la AII en anillos aórticos de SHR. Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Adulta.



**Figura 10.-** Efecto del envejecimiento sobre la contracción inducida por la FE en anillos aórticos de SHR. Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Adulta.



**Figura 11.-** Efecto del envejecimiento sobre la contracción inducida por la ET-1 (panel superior, izquierda), el U46619 (panel superior, derecha) y la Ach en presencia de LNAME,  $10^{-4}$  mol/L (panel inferior, centro) en anillos aórticos de SHR. Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Adulta.



**Figura 12.-** Efecto de la adición de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) al medio de incubación sobre la contracción inducida por la FE en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.

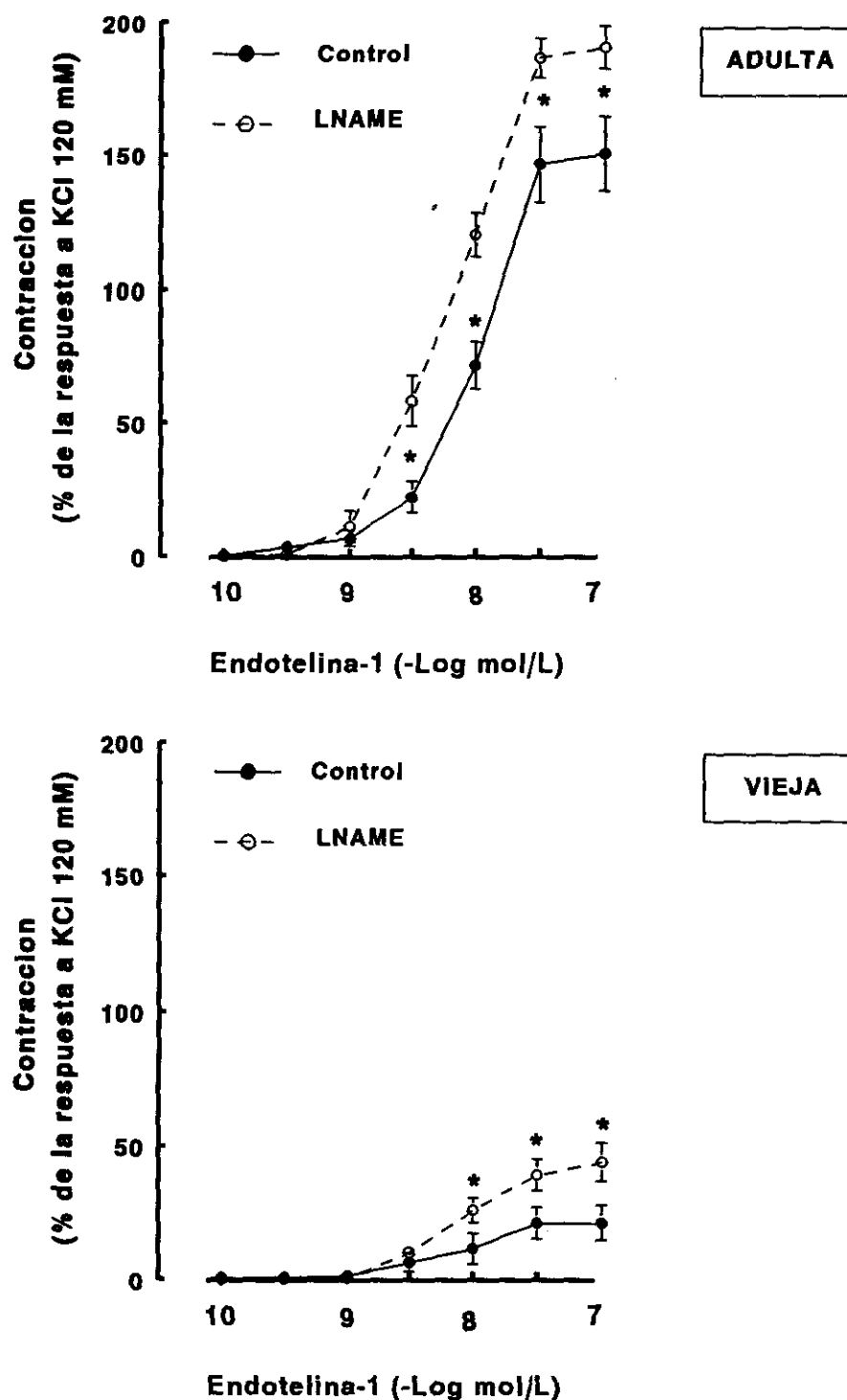
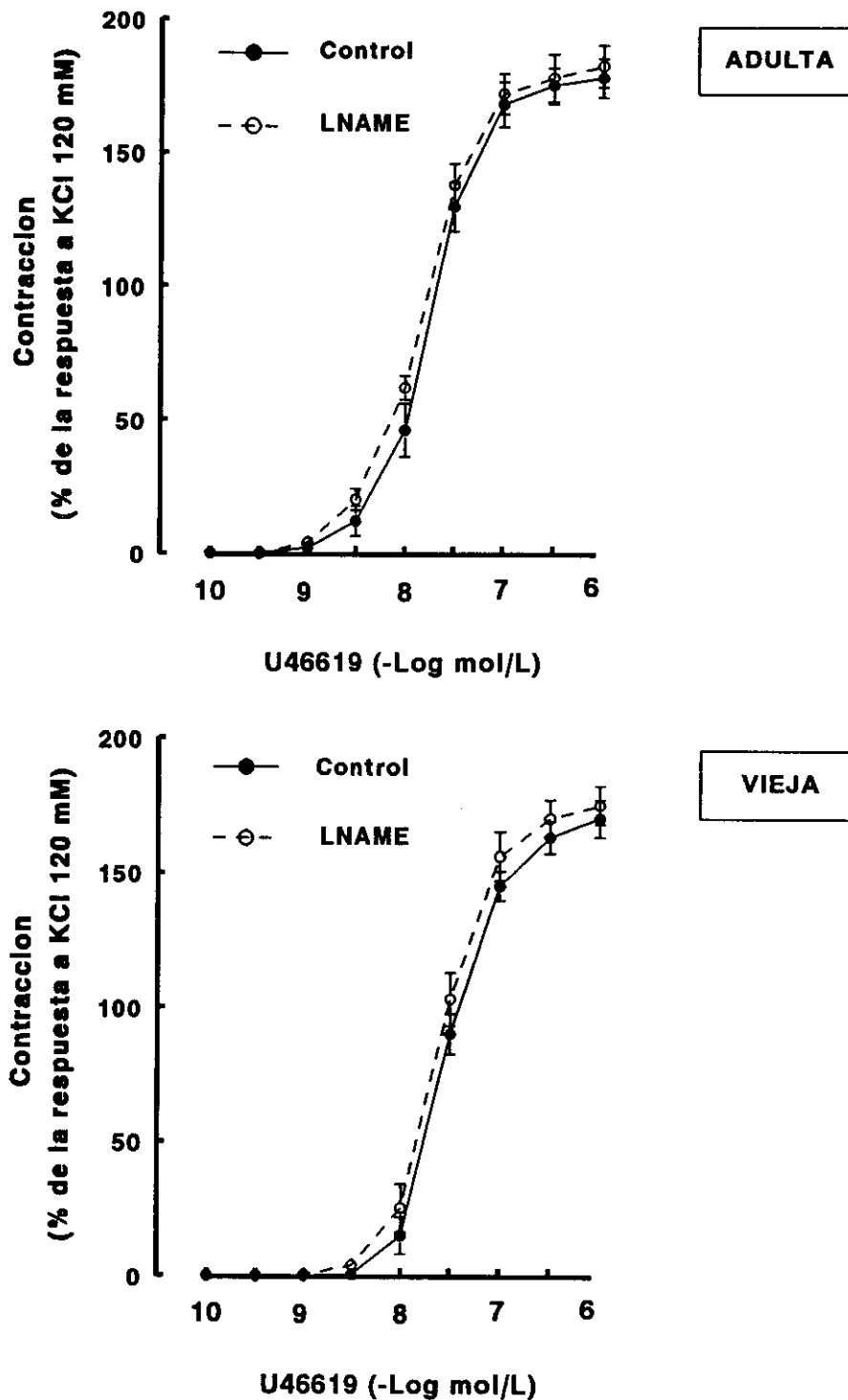


Figura 13.- Efecto de la adición de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) al medio de incubación sobre la contracción inducida por la ET-1 en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.





**Figura 14.-** Efecto de la adición de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) al medio de incubación sobre la contracción inducida por el U46619 en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.

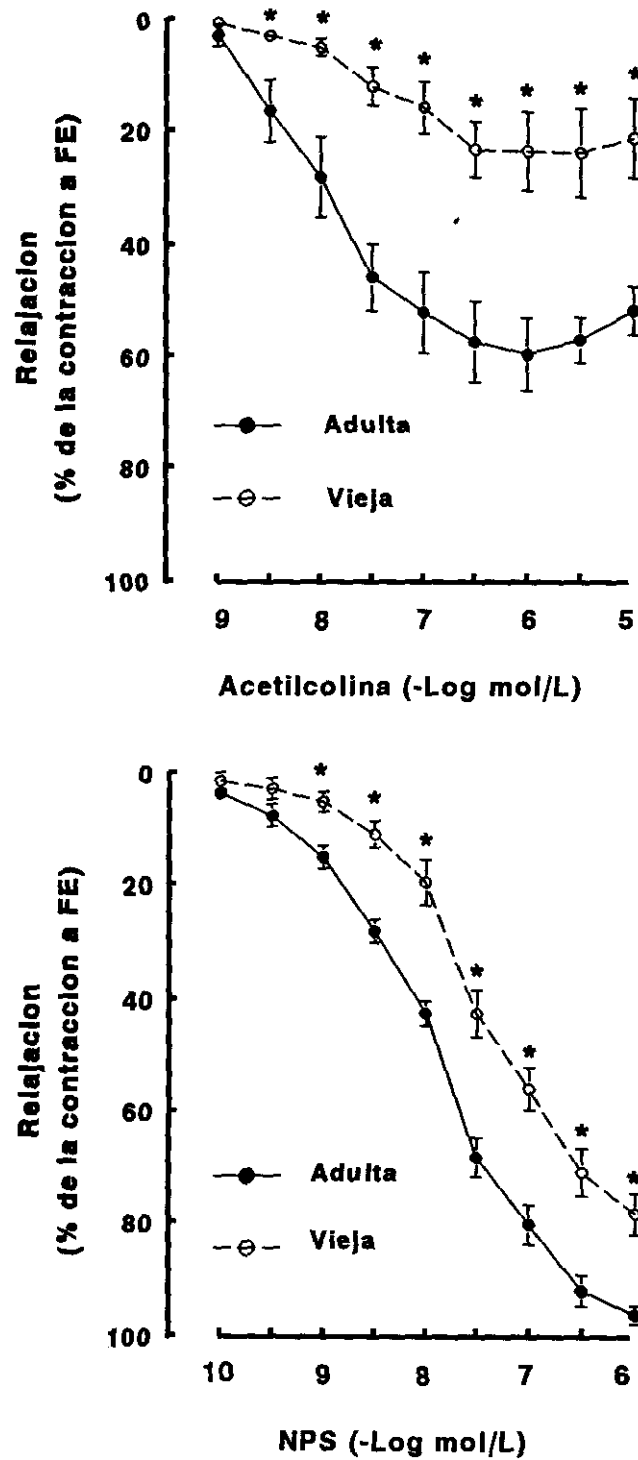
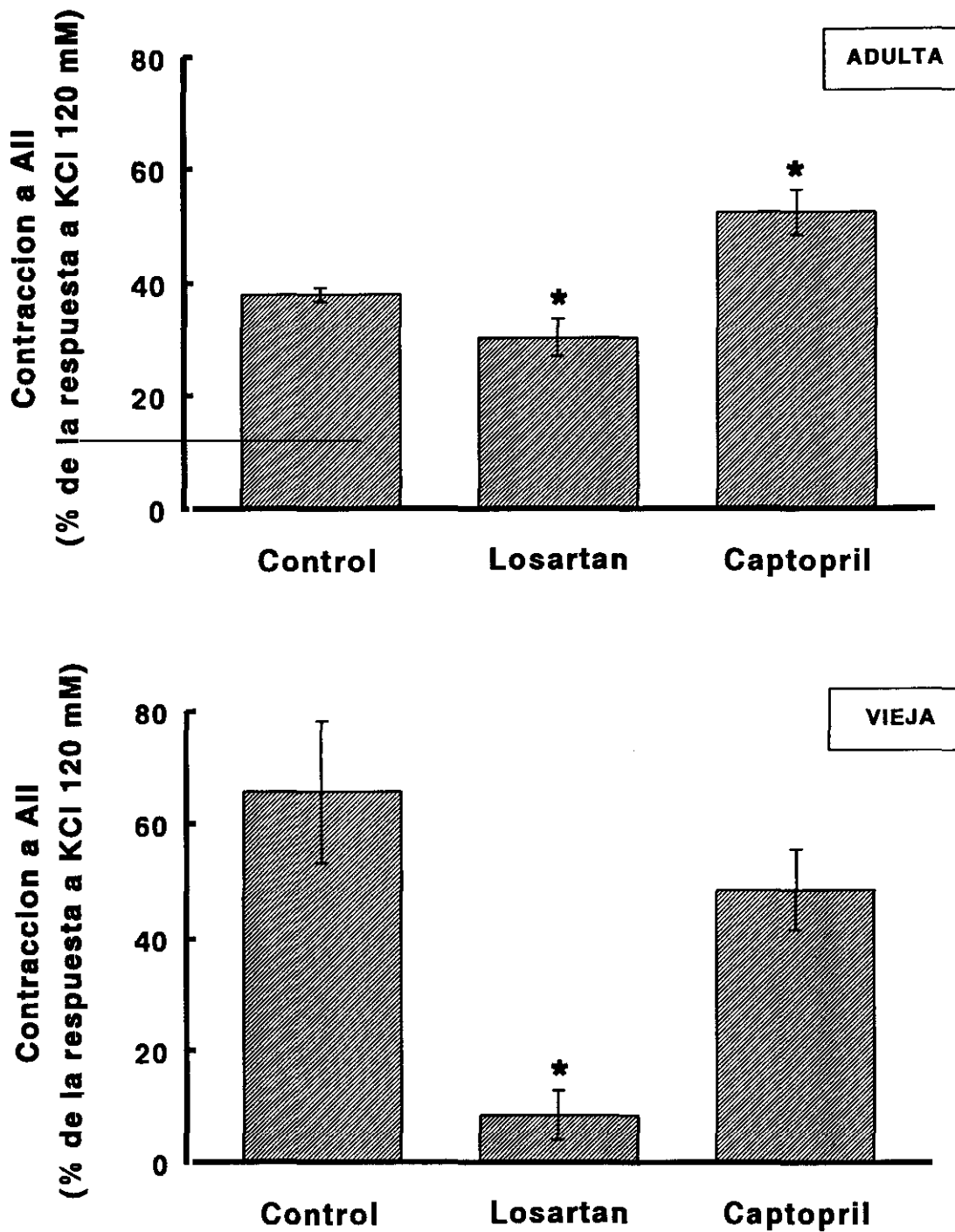
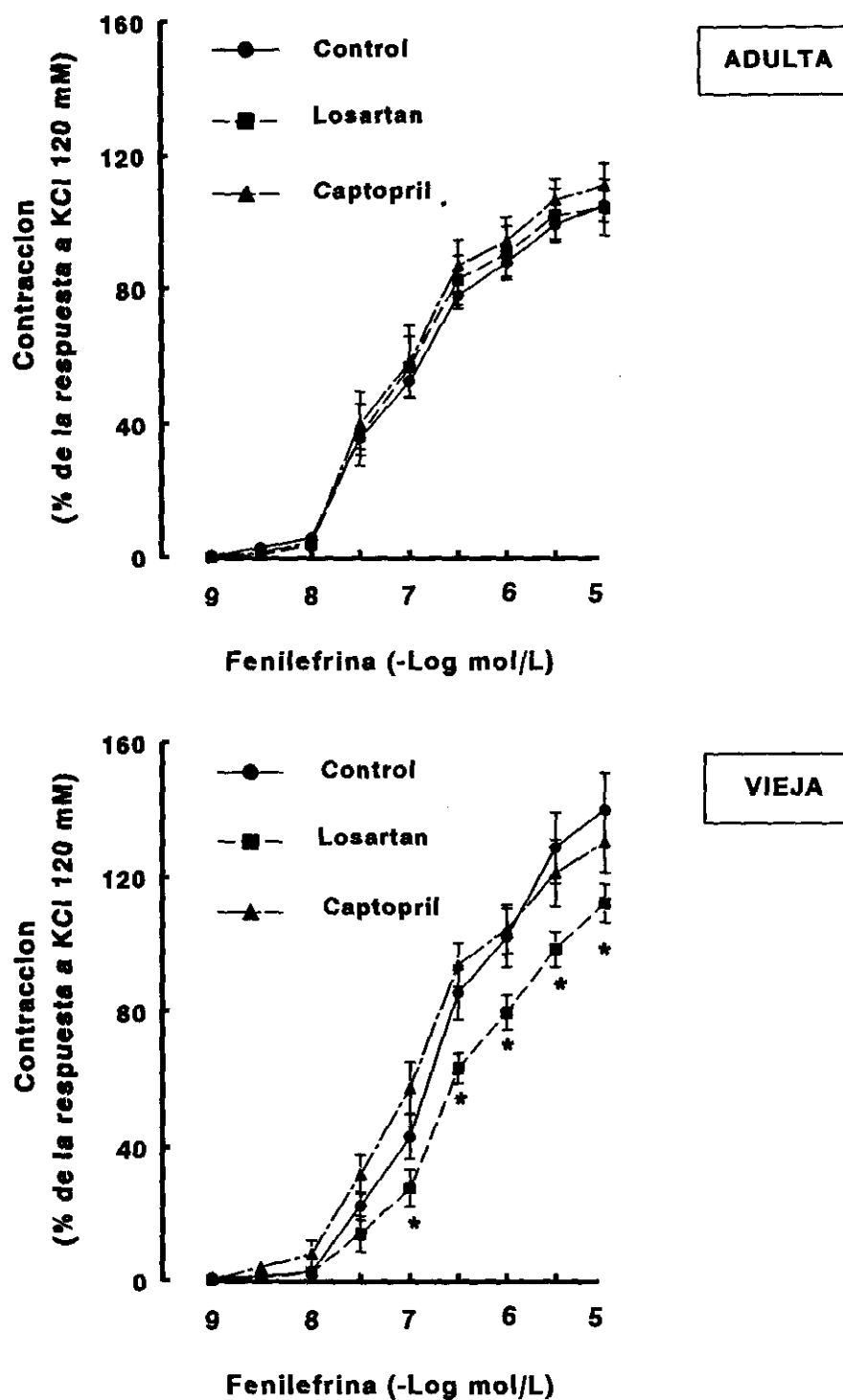


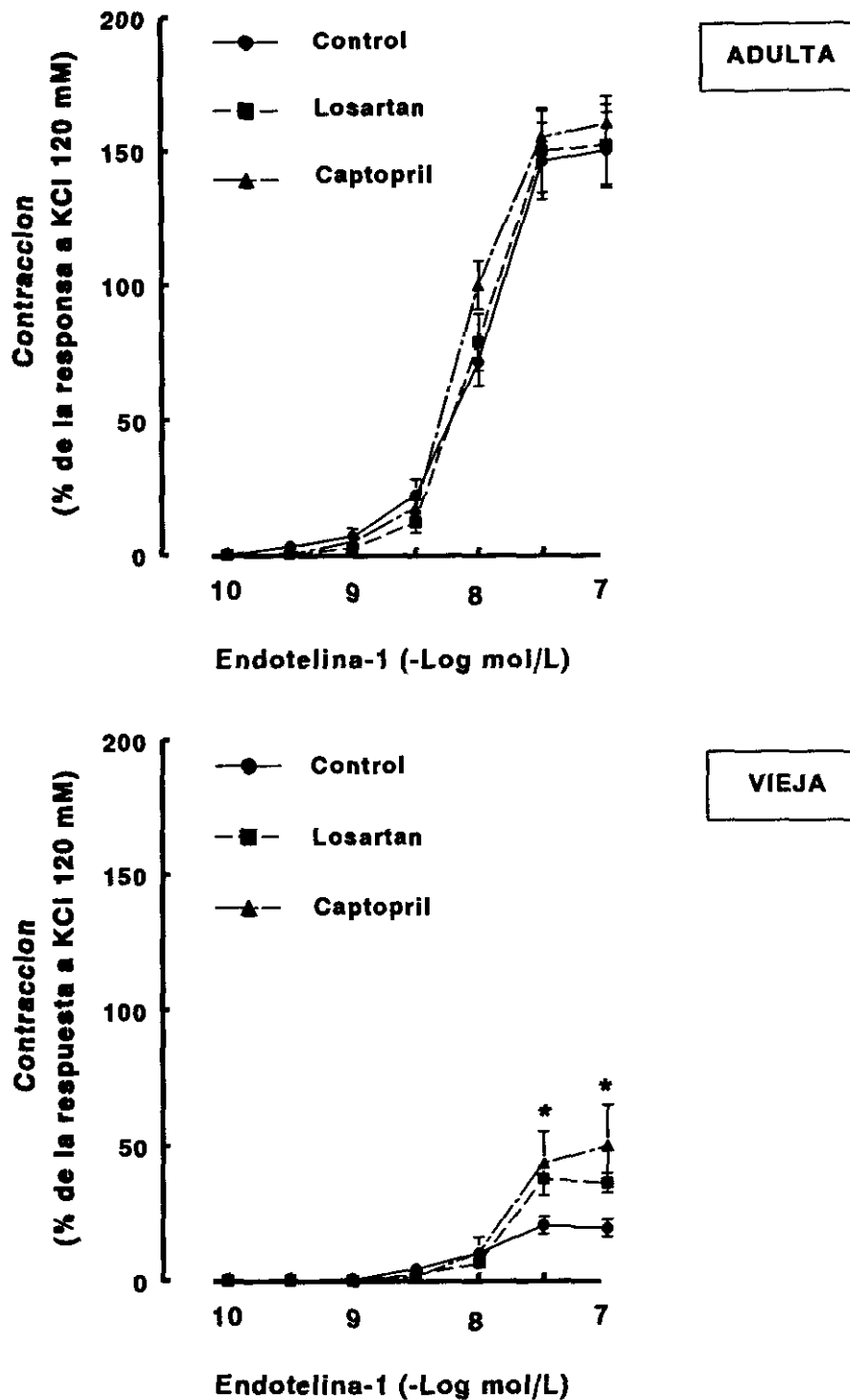
Figura 15.- Efecto del envejecimiento sobre la relajación inducida por la Ach (panel superior) y el NPS (panel inferior) en anillos aórticos de SHR. Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Adulta.



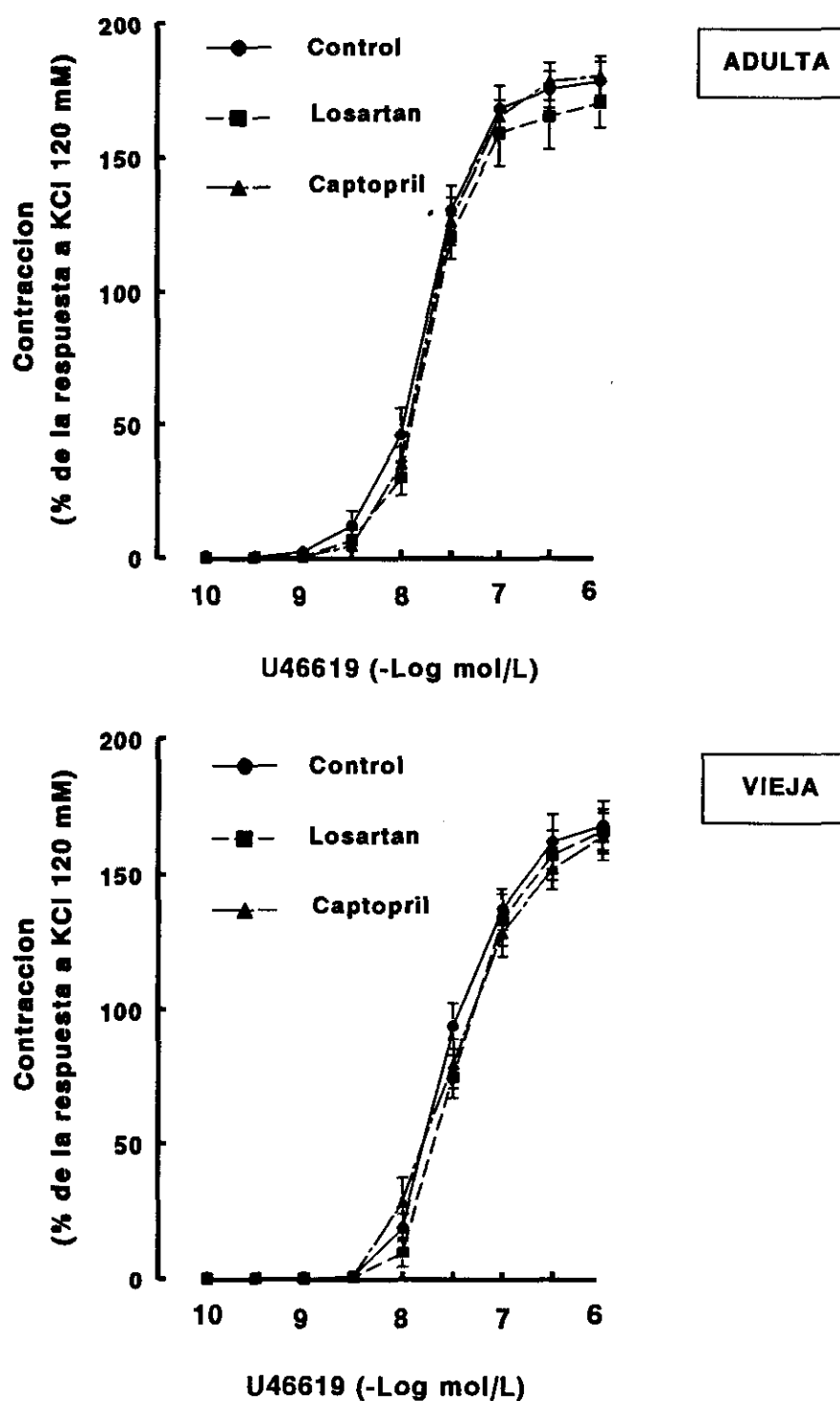
**Figura 16.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la contracción inducida por la AII en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.



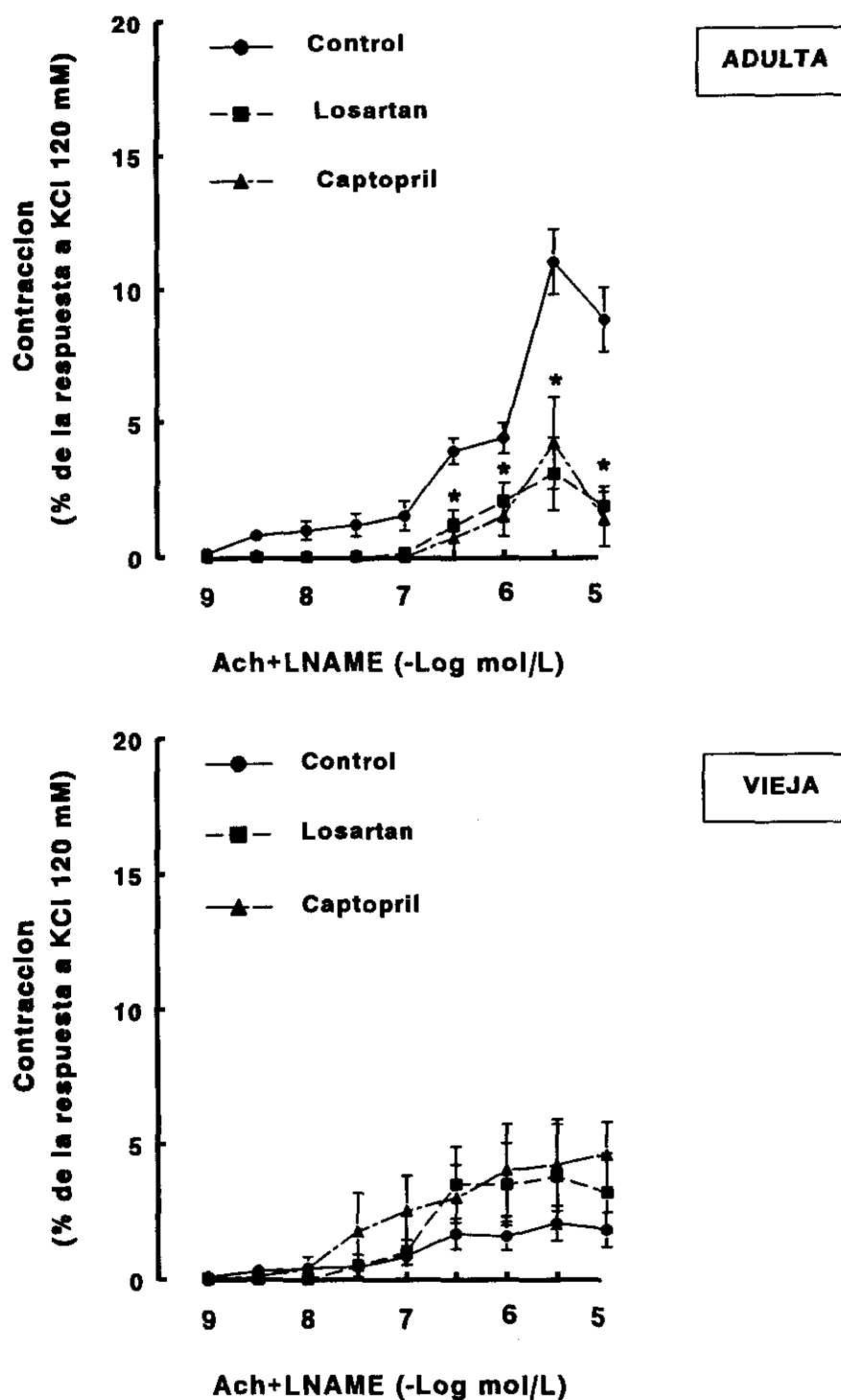
**Figura 17.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la contracción inducida por la FE en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.



**Figura 18.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la contracción inducida por la ET-1 en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.

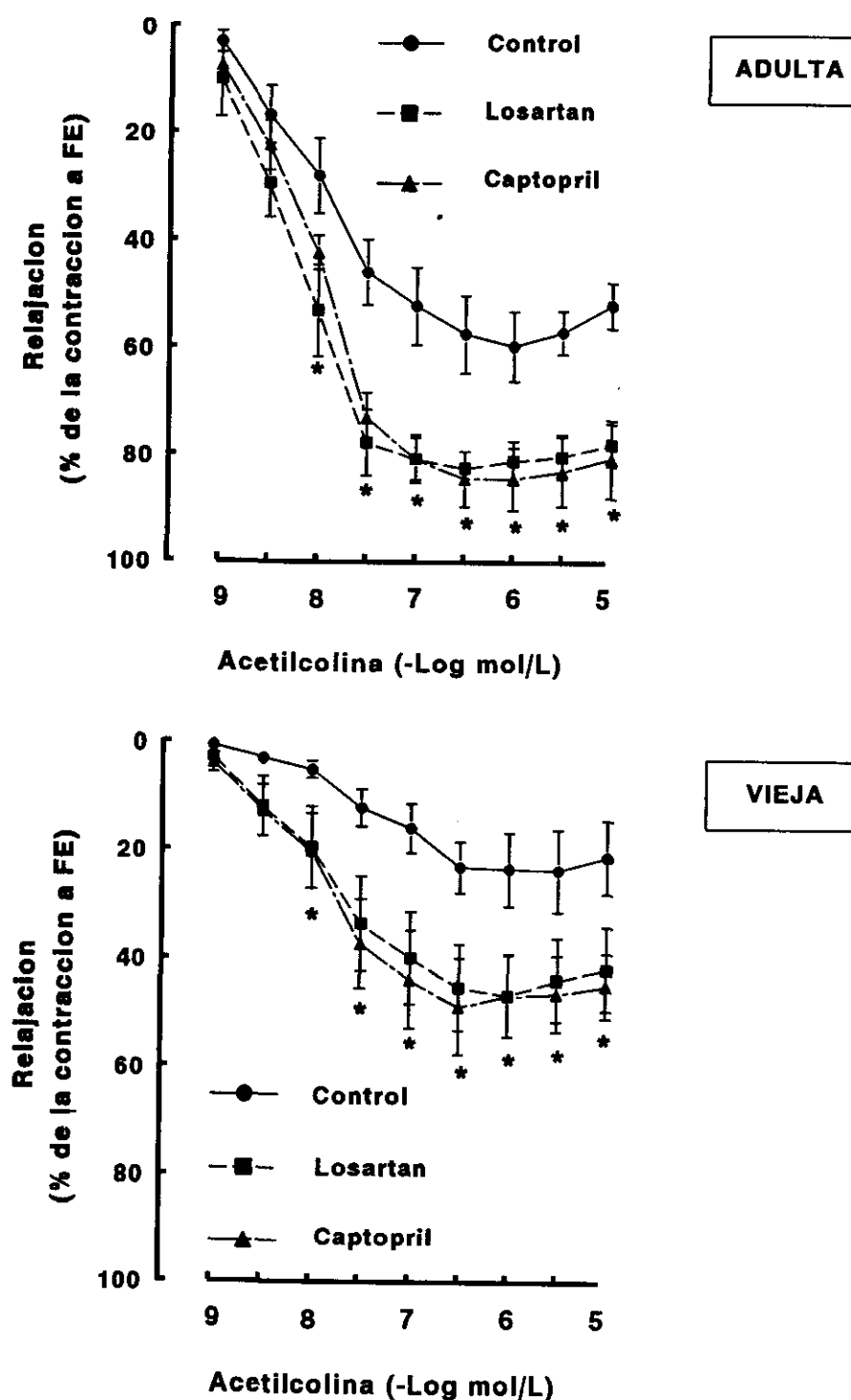


**Figura 19.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la contracción inducida por al U46619 en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.



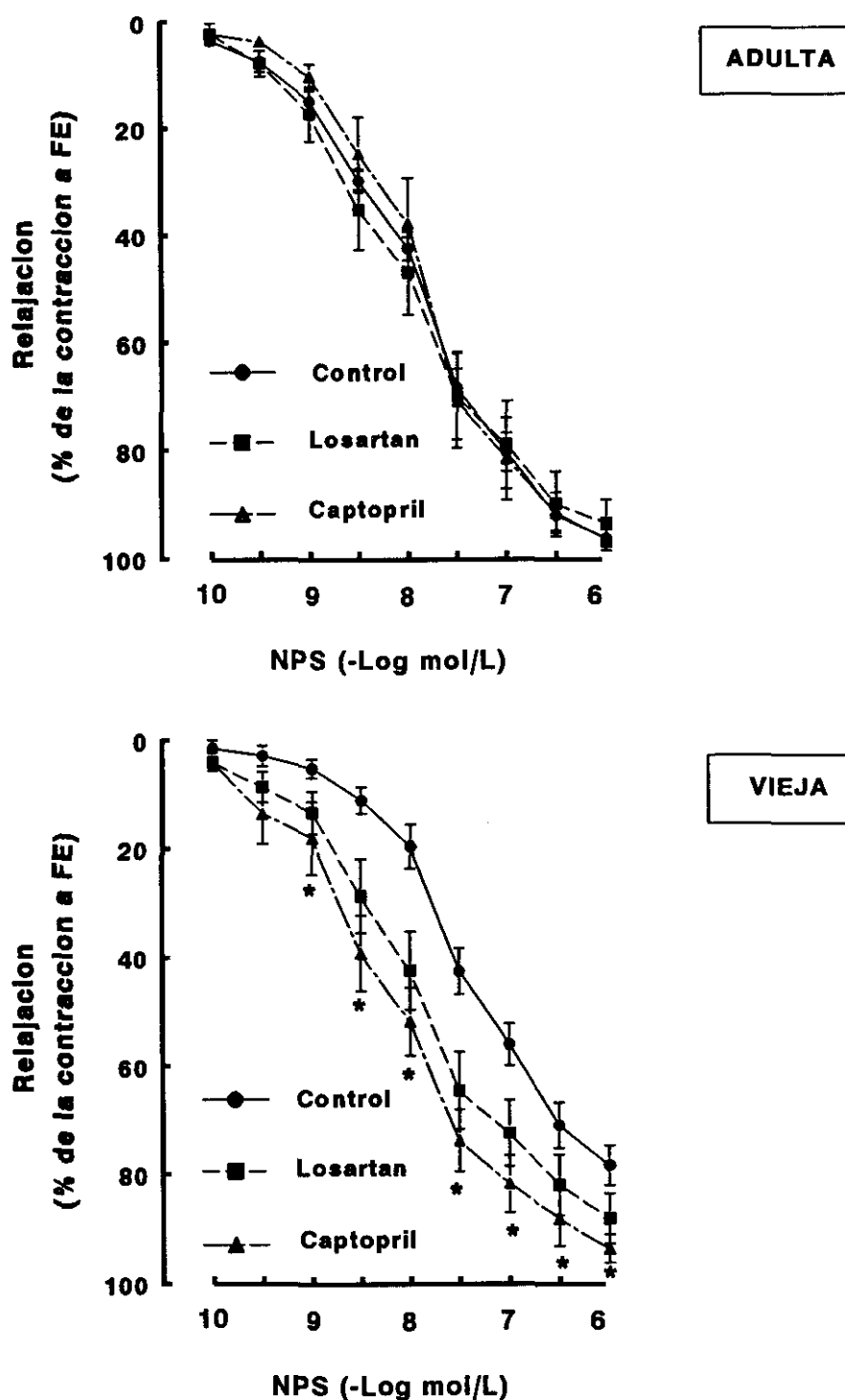
**Figura 20.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la contracción inducida por la Ach en presencia de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.

\*  $p < 0.05$  vs Control.



**Figura 21.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la relajación inducida por la Ach en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.





**Figura 22.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) administrado en el agua de bebida durante doce semanas sobre la relajación inducida por el NPS en anillos aórticos de SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.

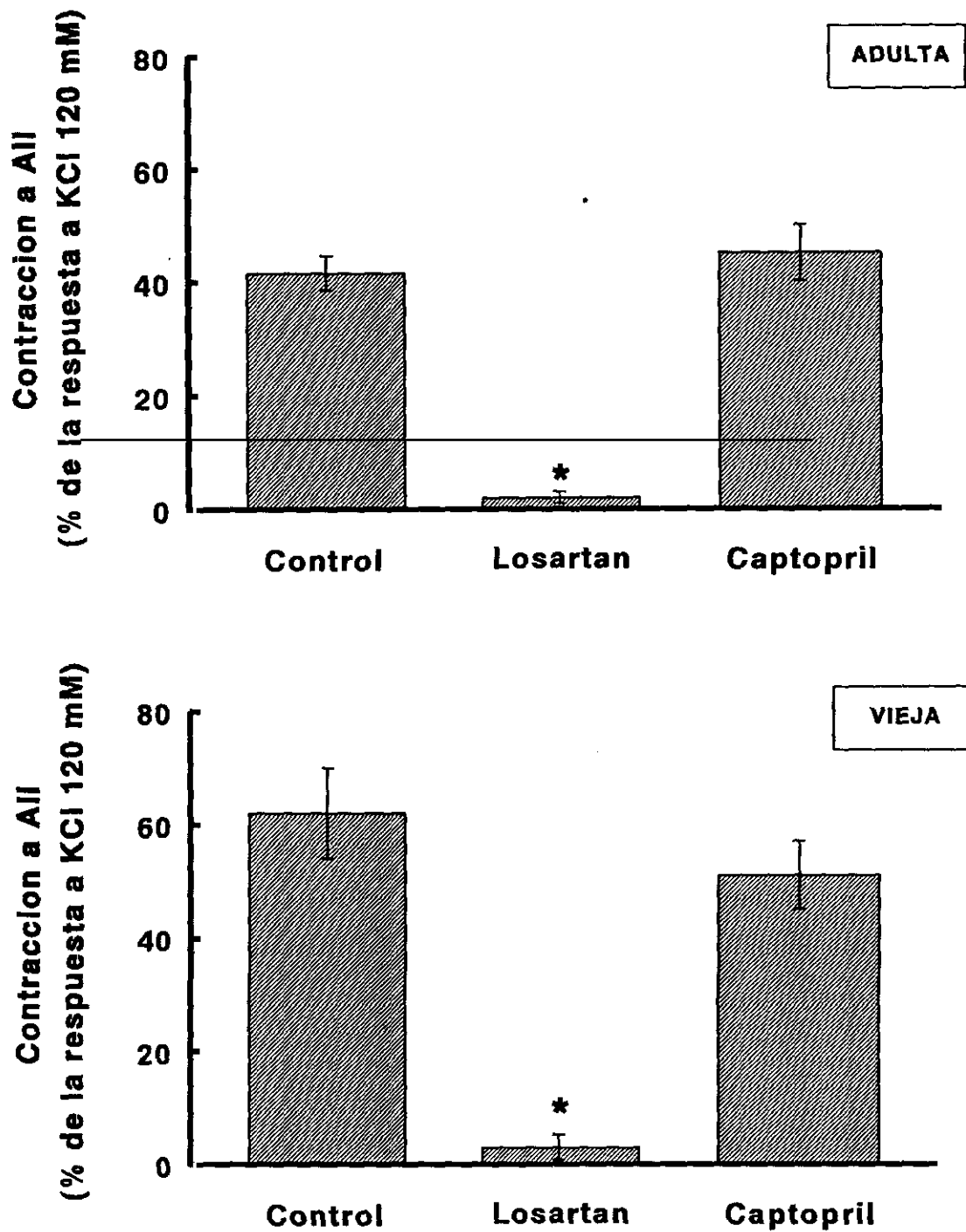
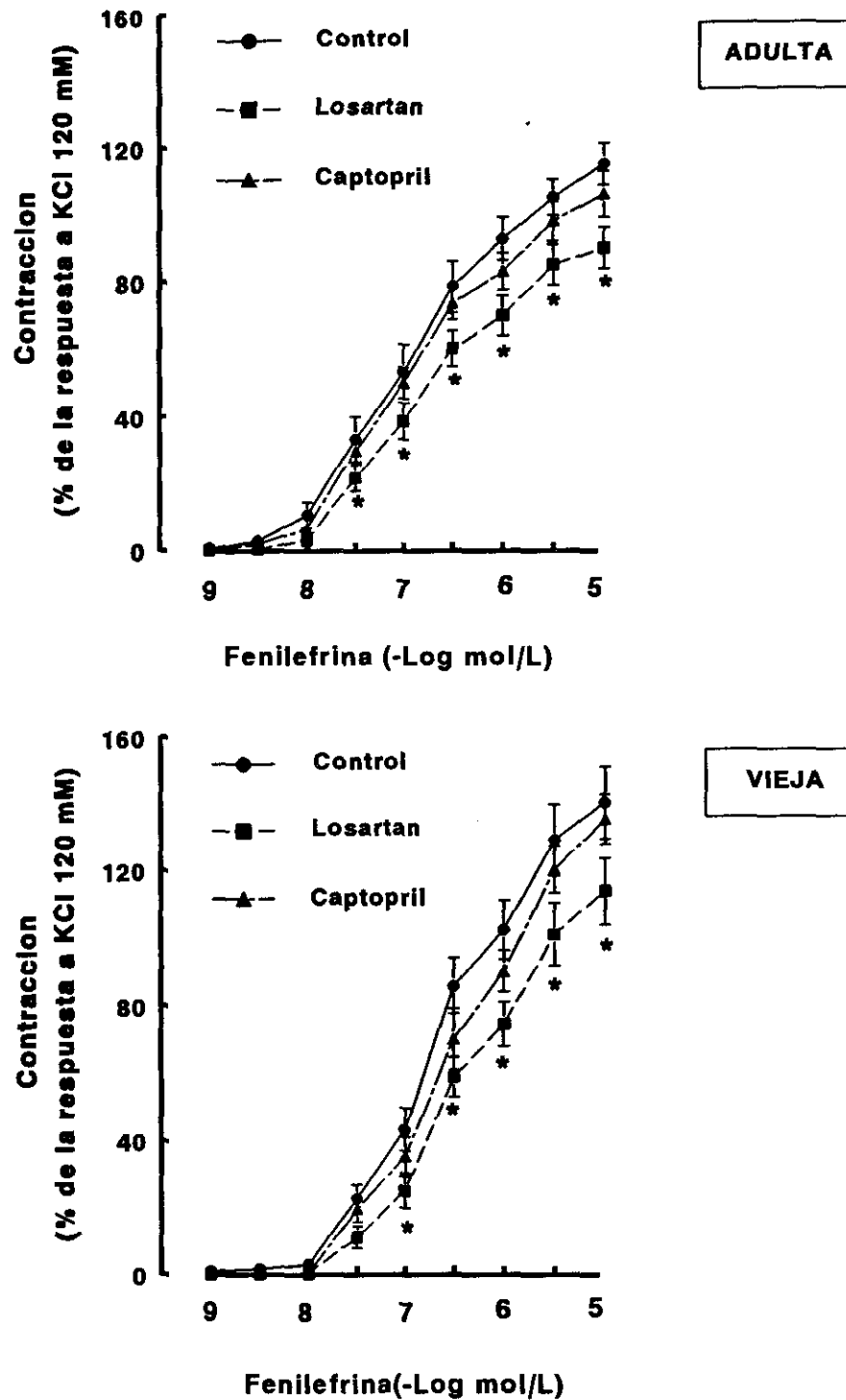
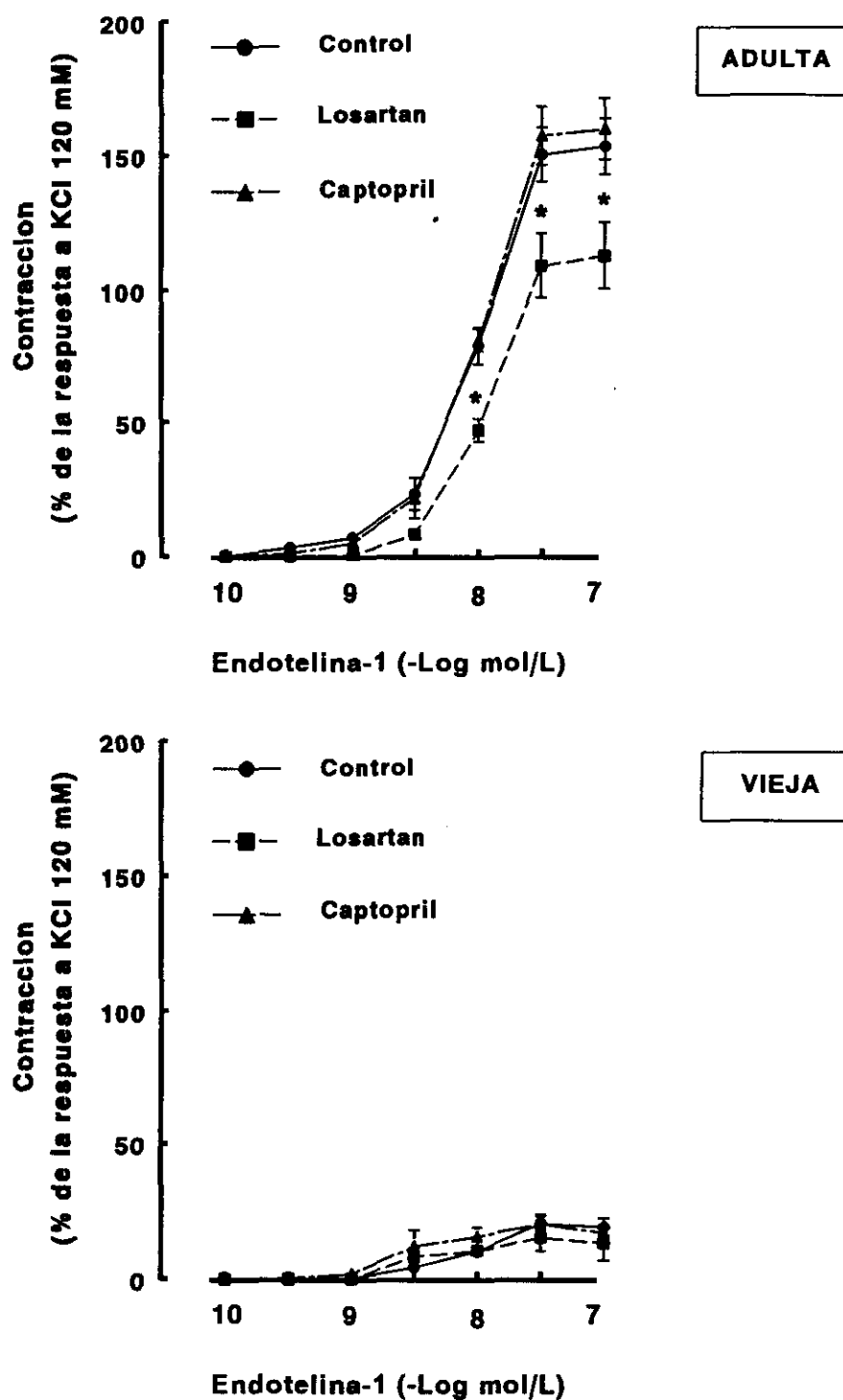


Figura 23.- Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la contracción inducida por la AII en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.  
\*  $p < 0.05$  vs Control.



**Figura 24.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la contracción inducida por la FE en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.

\*  $p < 0.05$  vs Control.



**Figura 25.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la contracción inducida por la ET-1 en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.

\*  $p < 0.05$  vs Control.

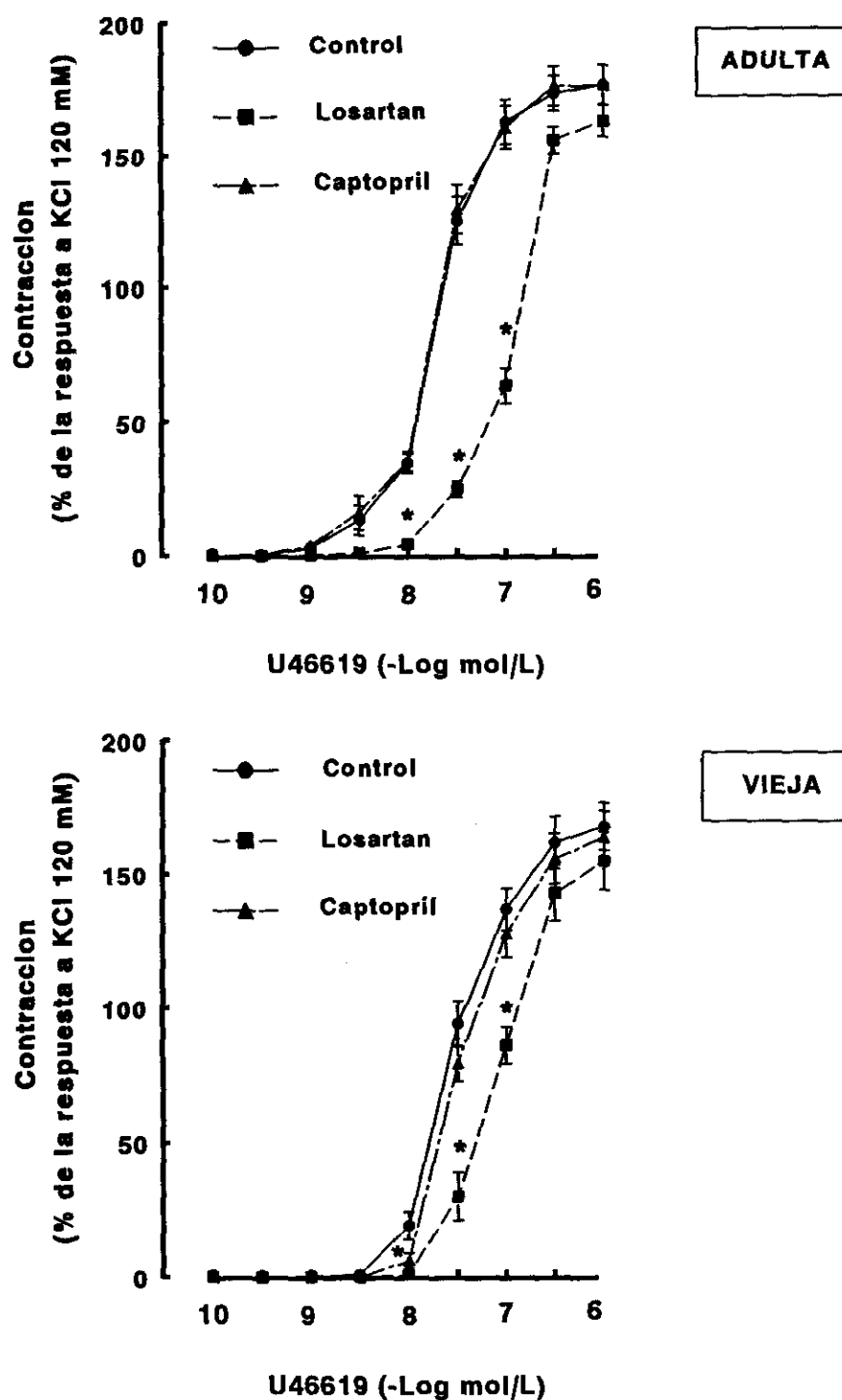
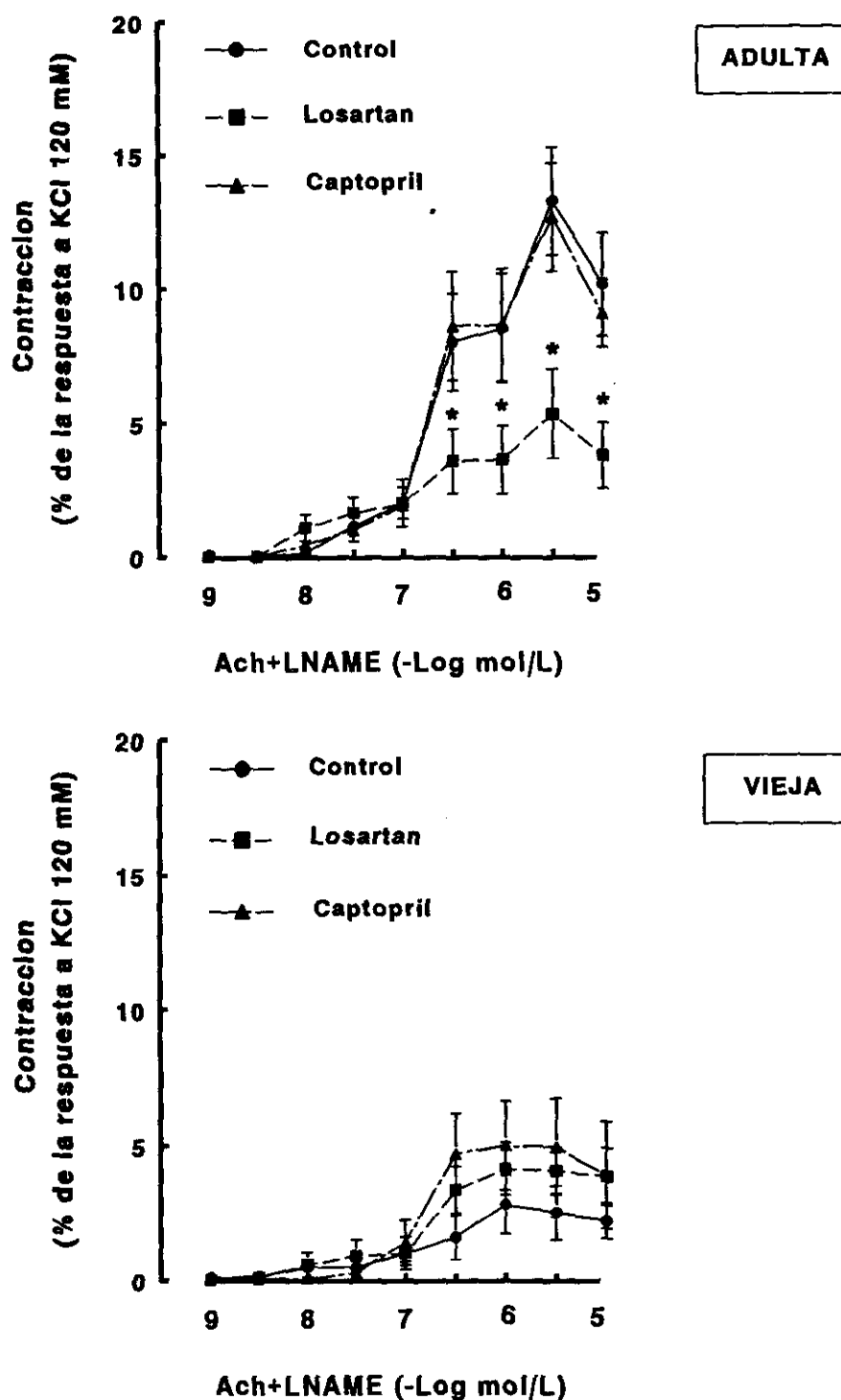
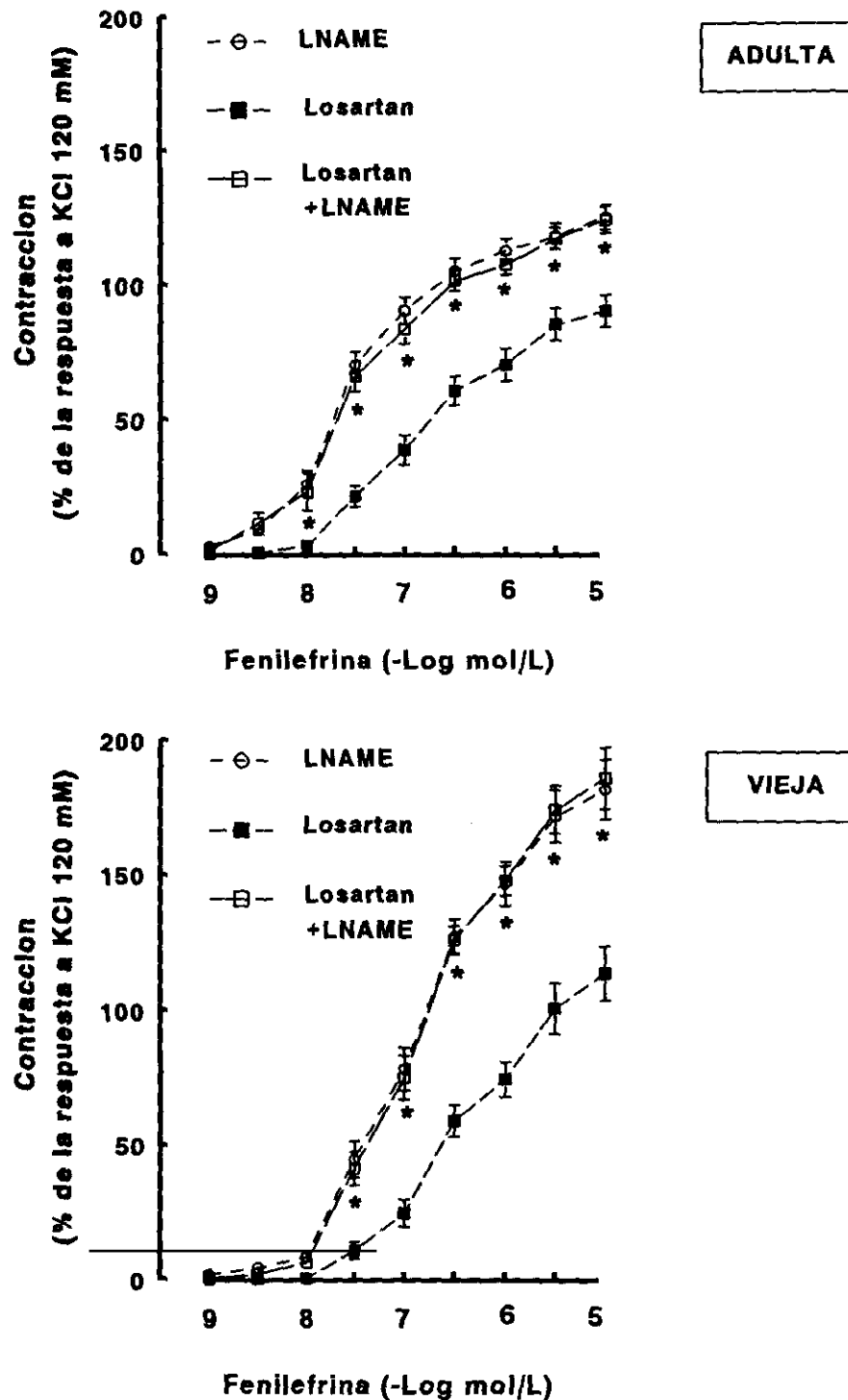


Figura 26.- Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la contracción inducida por el U46619 en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.

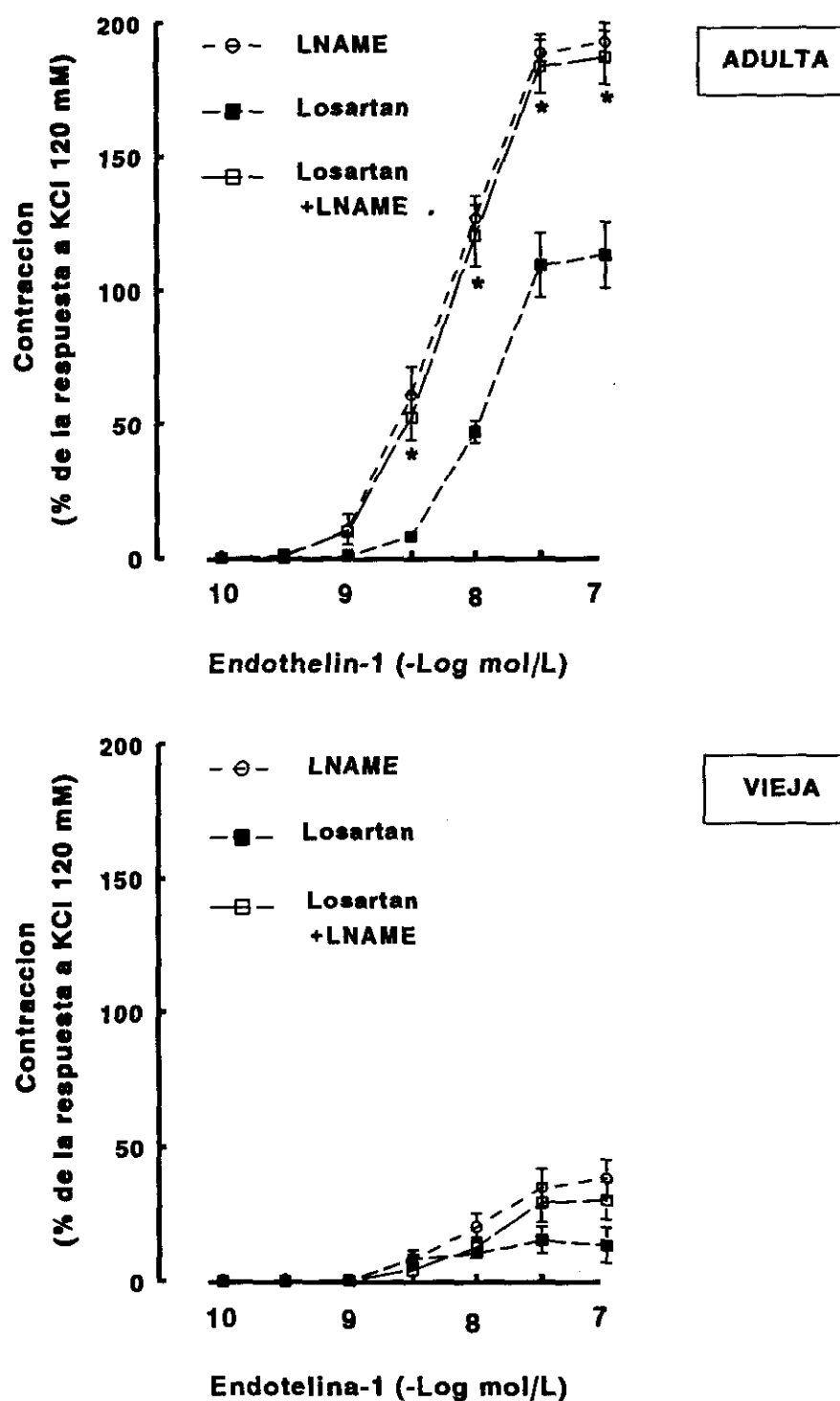
\*  $p < 0.05$  vs Control.



**Figura 27.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la contracción inducida por la Ach en presencia de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control.

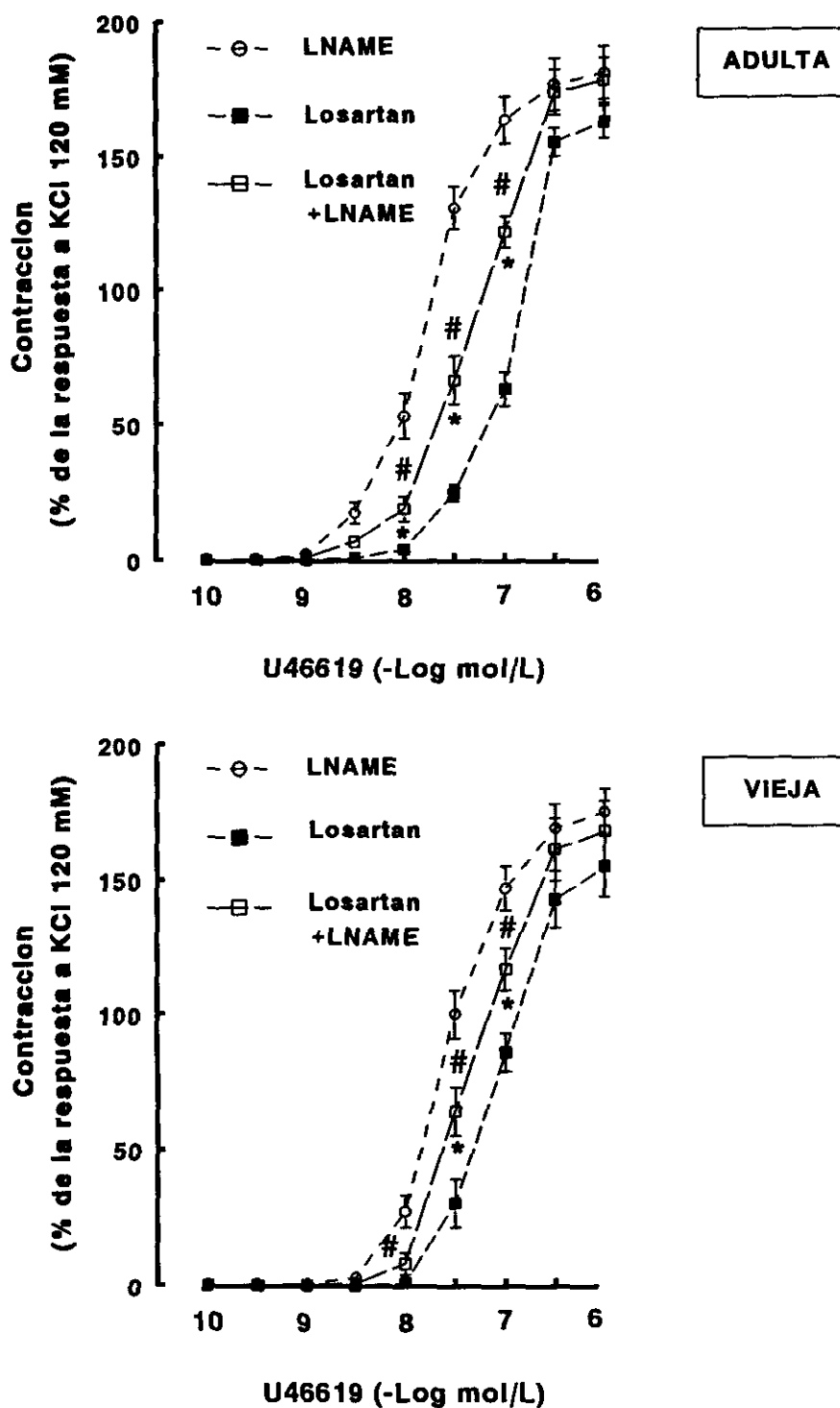


**Figura 28.-** Efecto de la adición de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) al medio de incubación sobre la contracción inducida por la FE en anillos aórticos preincubados en ausencia o presencia de Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Losartán.

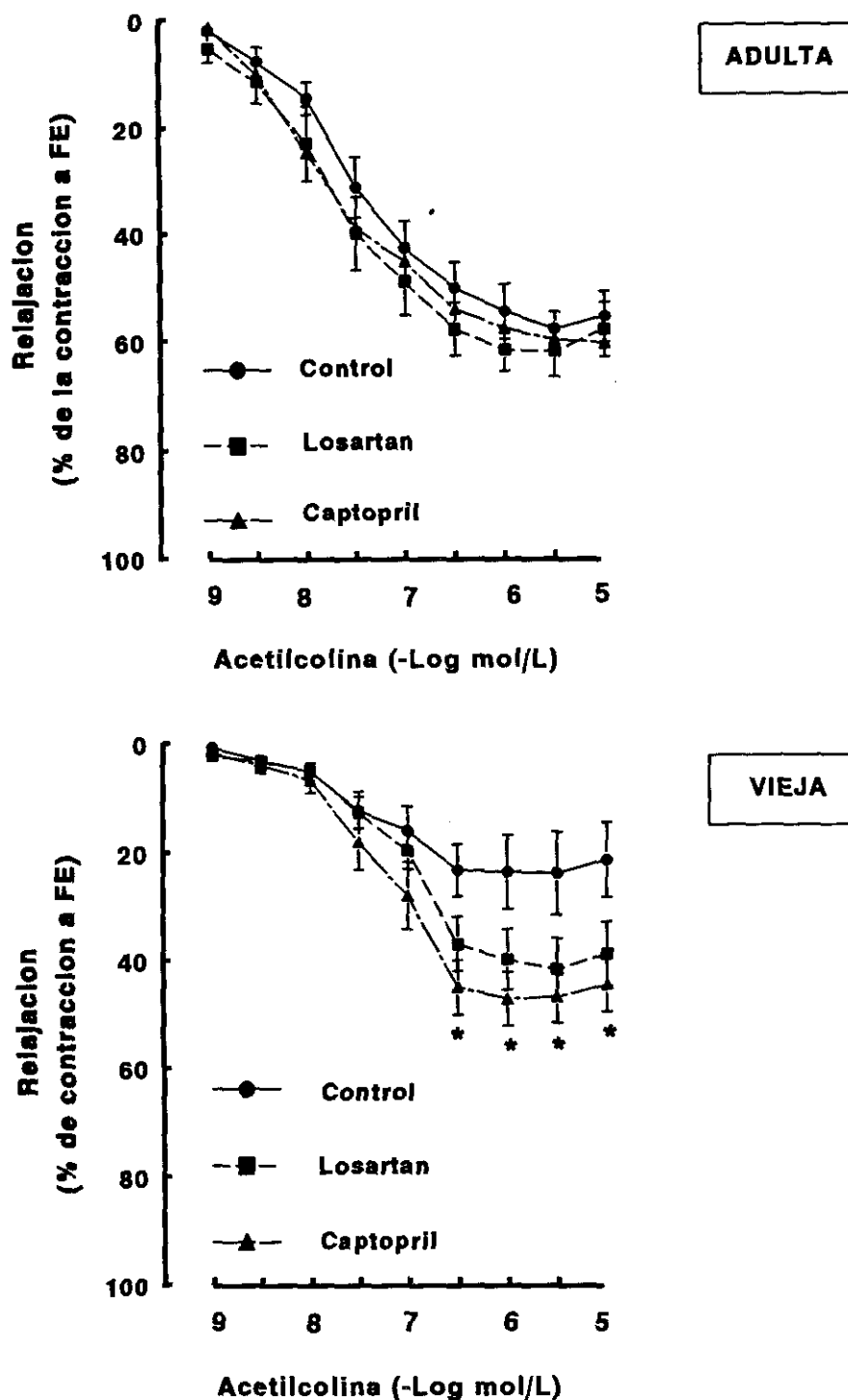


**Figura 29.-** Efecto de la adición de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) al medio de incubación sobre la contracción inducida por la ET-1 en anillos aórticos preincubados en ausencia o presencia de Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Losartán.

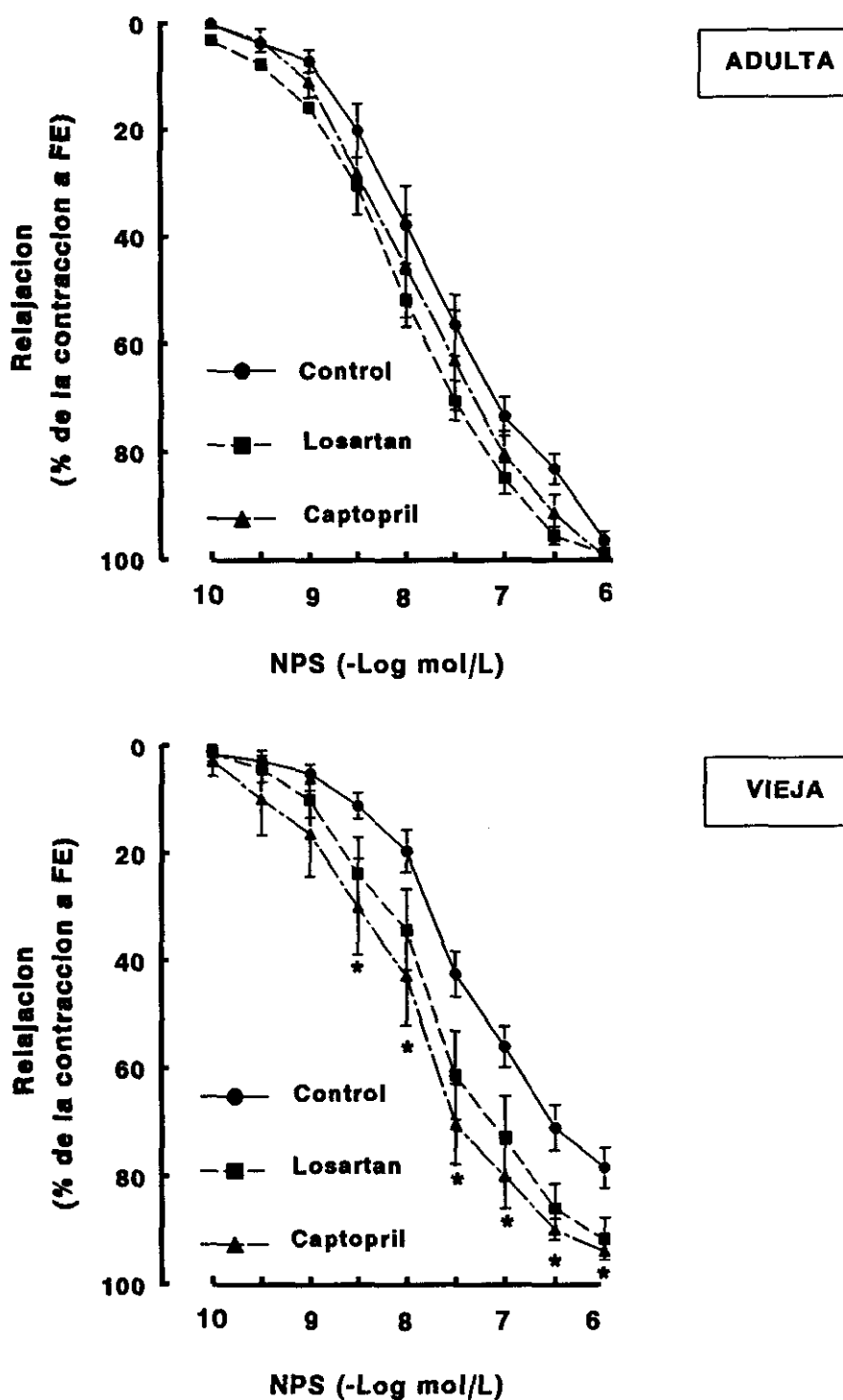




**Figura 30.-** Efecto de la adición de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L) al medio de incubación sobre la contracción inducida por el U46619 en anillos aórticos preincubados en ausencia o presencia de Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Losartán, #  $p < 0.05$  vs LNAME.



**Figura 31.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la relajación inducida por la Ach en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.  
\*  $p < 0.05$  vs Control.



**Figura 32.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre la relajación inducida por el NPS en SHR adultas (panel superior) y viejas (panel inferior). Los valores se expresan como la media  $\pm$  eem.

\*  $p < 0.05$  vs Control.

	ADULTA			VIEJA		
Tratamiento	Control	Losartán	Captopril	Control	Losartán	Captopril
PAS (mmHg)	196.9±4.1	162.7±2.7*	157.2±5.6*	201.2±8.4	157.6±6.9#	152.7±8.1#
[NO <sub>x</sub> ] plasmática (μmol/L)	15.7±3.2	47.8±9.3*	39.6±4.9*	19.6±8.2	38.0±5.6#	33.5±4.9#

Tabla 1.- Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) durante doce semanas sobre la PAS, y la concentración plasmática de nitratos y nitritos ([NO<sub>x</sub>] plasmática) en SHR adultas y viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta sin tratamiento, # p<0.05 vs Vieja sin tratamiento.

	ADULTA			VIEJA		
Tratamiento	Control	Losartán	Captopril	Control	Losartán	Captopril
Peso (g)	409.2±11.1	408.0±6.7	397.3±6.2	375.8±10.7*	378.5±12.2*	376.2±7.5*
Peso Corazón (g/100g peso)	0.39±0.01	0.33±0.01*	0.34±0.01*	0.65±0.05*	0.45±0.06#	0.41±0.05#
Peso Aorta (mg/10mm/100g peso)	1.53±0.05	1.40±0.02*	1.36±0.06*	1.88±0.09*	1.48±0.08#	1.49±0.10#

Tabla 2.- Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) durante doce semanas sobre el peso corporal, el peso relativo del corazón y de la aorta en SHR adultas y viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta sin tratamiento, # p<0.05 vs Vieja sin tratamiento.

Tratamiento	ADULTA			VIEJA		
	Control	Losartán	Captopril	Control	Losartán	Captopril
KCl (valores de ED <sub>50</sub> )	31.40±4.29	28.82±3.47	34.38±4.78	18.52±5.51*	21.36±4.15*	23.06±3.05*
KCl (máxima respuesta)	1.34±0.11	1.31±0.09	1.32±0.08	0.94±0.09*	0.96±0.08*	1.03±0.05*

**Tabla 3.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) durante doce semanas sobre los valores de ED<sub>50</sub> (mM) y la contracción máxima (g/mg de tejido) inducida por el KCl en anillos aórticos de SHR adultas y viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta sin tratamiento.

Preincubación	ADULTA			VIEJA		
	Control	Losartán	Captopril	Control	Losartán	Captopril
KCl (valores de ED <sub>50</sub> )	37.28±5.63	31.26±4.41	35.08±3.87	19.24±6.35*	16.45±4.06*	18.98±3.64*
KCl (máxima respuesta)	1.42±0.08	1.38±0.07	1.40±0.06	0.89±0.06*	0.84±0.04*	0.86±0.08*

**Tabla 4.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán (10<sup>-5</sup> mol/L) y Captopril (10<sup>-5</sup> mol/L) sobre los valores de ED<sub>50</sub> (mM) y la contracción máxima (g/mg de tejido) inducida por el KCl en anillos aórticos de SHR adultas y viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta sin tratamiento.

	ADULTA		VIEJA	
	Valores de pD <sub>2</sub>	Máxima respuesta	Valores de pD <sub>2</sub>	Máxima respuesta
FE	6.80±0.09	114.28±5.43	7.01±0.17	150.32±6.56*
FE+LNAME	7.32±0.12#	143.62±6.75#	7.35±0.07#	181.92±6.60*#
ET-1	8.01±0.02	157.46±8.83	7.72±0.04*	30.69±11.77*
ET-1+LNAME	8.20±0.03#	195.59±7.98#	7.83±0.02*#	58.51±6.31*#
U46619	7.61±0.05	179.34±6.69	7.03±0.12*	174.49±5.89
U46619+LNAME	7.68±0.04	183.50±7.72	7.05±0.06*	188.12±11.1

Tabla 5.- Efecto del envejecimiento sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la FE, la ET-1 y el U46619, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en anillos aórticos de SHR. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta, # p<0.05 vs en ausencia de LNAME.

	ADULTA		VIEJA	
	Valores de pD <sub>2</sub>	Máxima respuesta	Valores de pD <sub>2</sub>	Máxima respuesta
Ach	7.48±0.14	59.8±3.25	7.33±0.15	24.90±6.48*
NPS	7.70±0.12	100.40±5.42	7.32±0.04*	83.95±4.40*

Tabla 6.- Efecto del envejecimiento sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la relajación máxima (% de relajación respecto de la contracción a FE) inducida por la Ach y el NPS en anillos aórticos de SHR. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta.

ADULTA	Tratamiento	Control	Losartán	Captopril
FE	Valores de $pD_2$	$6.76 \pm 0.10$	$6.81 \pm 0.08$	$6.80 \pm 0.11$
	Máxima respuesta	$109.97 \pm 5.31$	$111.43 \pm 4.62$	$116.25 \pm 6.20$
FE+LNAME	Valores de $pD_2$	$7.36 \pm 0.19\#$	$7.40 \pm 0.12\#$	$7.39 \pm 0.20\#$
	Máxima respuesta	$146.18 \pm 6.14\#$	$150.95 \pm 11.84\#$	$153.62 \pm 10.22\#$
ET-1	Valores de $pD_2$	$8.02 \pm 0.03$	$7.98 \pm 0.06$	$8.07 \pm 0.04$
	Máxima respuesta	$154.91 \pm 6.81$	$156.23 \pm 5.48$	$163.16 \pm 7.05$
ET-1+LNAME	Valores de $pD_2$	$8.25 \pm 0.04\#$	$8.21 \pm 0.05\#$	$8.19 \pm 0.06\#$
	Máxima respuesta	$191.50 \pm 8.46\#$	$193.81 \pm 9.30\#$	$187.99 \pm 10.12\#$
U46619	Valores de $pD_2$	$7.59 \pm 0.04$	$7.63 \pm 0.06$	$7.57 \pm 0.07$
	Máxima respuesta	$180.93 \pm 9.25$	$176.22 \pm 6.73$	$181.02 \pm 5.41$
U46619+LNAME	Valores de $pD_2$	$7.67 \pm 0.07$	$7.69 \pm 0.10$	$7.70 \pm 0.08$
	Máxima respuesta	$182.54 \pm 11.02$	$179.8 \pm 6.92$	$186.35 \pm 7.84$

Tabla 7.- Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) durante doce semanas sobre los valores de  $pD_2$  y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la FE, la ET-1 y el U46619, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en SHR adultas. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  eem. #  $p < 0.05$  vs en ausencia de LNAME.

VIEJA	Tratamiento	Control	Losartán	Captopril
FE	Valores de pD <sub>2</sub>	6.89±0.09	6.90±0.08	7.10±0.14
	Máxima respuesta	145.26±9.72	118.31±8.37*	138.99±10.53
FE+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	7.42±0.08#	7.38±0.09#	7.40±0.09#
	Máxima respuesta	180.39±7.45#	174.69±12.10#	183.87±11.9#
ET-1	Valores de pD <sub>2</sub>	7.73±0.04	7.70±0.05	7.68±0.05
	Máxima respuesta	25.96±6.24	41.98±7.06*	50.35±8.11*
ET-1+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	7.90±0.06#	7.98±0.08#	8.02±0.06#
	Máxima respuesta	49.26±4.33#	62.14±7.56*#	71.73±12.31*#
U46619	Valores de pD <sub>2</sub>	7.05±0.09	7.02±0.07	7.03±0.06
	Máxima respuesta	176.32±7.84	174.95±10.17	171.89±9.79
U46619+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	7.11±0.08	7.10±0.11	7.05±0.12
	Máxima respuesta	180.35±16.4	178.21±9.69	185.78±10.9

Tabla 8.- Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) durante doce semanas sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la FE, la ET-1 y el U46619, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en SHR viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Control, # p<0.05 vs en ausencia de LNAME.



	ADULTA			VIEJA		
Tratamiento	Control	Losartán	Captopril	Control	Losartán	Captopril
NPS (valores de pD <sub>2</sub> )	7.70±0.12	7.75±0.15	7.99±0.17	7.32±0.04*	7.83±0.18#	7.82±0.28#
NPS (máxima respuesta)	100.40±5.42	98.34±3.18	102.3±6.37	83.95±4.40*	92.58±3.64#	93.24±4.65#

**Tabla 9.-** Efecto del tratamiento con Losartán (10 mg/Kg/día) y Captopril (60 mg/Kg/día) durante doce semanas sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la relajación máxima (% de relajación respecto de la contracción a FE) inducida por el NPS en anillos aórticos en SHR adultas y viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta sin tratamiento, # p<0.05 vs Vieja sin tratamiento.

	ADULTA			VIEJA		
Preincubación	Control	Losartán	Captopril	Control	Losartán	Captopril
NPS (valores de pD <sub>2</sub> )	7.68±0.20	7.80±0.19	7.73±0.18	7.32±0.04*	7.62±0.17#	7.80±0.17#
NPS (máxima respuesta)	100.9±4.70	103.5±3.51	104.9±5.63	83.95±4.40*	96.65±4.89#	97.69±2.55#

**Tabla 10.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán (10<sup>-5</sup> mol/L) y Captopril (10<sup>-5</sup> mol/L) sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la relajación máxima (% de relajación respecto de la contracción a FE) inducida por el NPS en SHR adultas y viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Adulta sin tratamiento, # p<0.05 vs Vieja sin tratamiento.

ADULTA	Preincubación	Control	Losartán	Captopril
FE	Valores de $pD_2$	$6.70 \pm 0.19$	$6.71 \pm 0.12$	$6.73 \pm 0.20$
	Máxima respuesta	$118.31 \pm 8.45$	$95.93 \pm 7.79^*$	$115.60 \pm 10.21$
FE+LNAME	Valores de $pD_2$	$7.39 \pm 0.14\#$	$7.37 \pm 0.16\#$	$7.40 \pm 0.18\#$
	Máxima respuesta	$140.12 \pm 10.10\#$	$139.50 \pm 9.25\#$	$137.38 \pm 11.20\#$

Tabla 11.- Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre los valores de  $pD_2$  y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la FE, en presencia o ausencia de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L), en SHR adultas. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control, #  $p < 0.05$  vs FE sin LNAME.

VIEJA	Preincubación	Control	Losartán	Captopril
FE	Valores de $pD_2$	$6.79 \pm 0.06$	$6.88 \pm 0.09$	$6.81 \pm 0.11$
	Máxima respuesta	$144.96 \pm 4.57$	$116.20 \pm 10.6^*$	$138.60 \pm 8.50$
FE+LNAME	Valores de $pD_2$	$7.30 \pm 0.10\#$	$7.25 \pm 0.09\#$	$7.28 \pm 0.14\#$
	Máxima respuesta	$180.35 \pm 6.41\#$	$184.21 \pm 12.66\#$	$183.78 \pm 9.32\#$

Tabla 12.- Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán ( $10^{-5}$  mol/L) y Captopril ( $10^{-5}$  mol/L) sobre los valores de  $pD_2$  y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la FE, en presencia o ausencia de LNAME ( $10^{-4}$  mol/L), en SHR viejas. Los valores se expresaron como media  $\pm$  eem. \*  $p < 0.05$  vs Control, #  $p < 0.05$  vs FE sin LNAME.

ADULTA	Preincubación	Control	Losartán	Captopril
ET-1	Valores de pD <sub>2</sub>	7.99±0.02	7.96±0.02	7.99±0.01
	Máxima respuesta	155.65±9.88	112.14±12.85*	158.22±11.44
ET-1+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	8.17±0.02#	8.15±0.02#	8.19±0.03#
	Máxima respuesta	193.45±7.65#	186.33±10.94#	192.01±8.92#

Tabla 13.- Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán (10<sup>-5</sup> mol/L) y Captopril (10<sup>-5</sup> mol/L) sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la ET-1, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en SHR adultas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Control, # p<0.05 vs ET-1 sin LNAME.

VIEJA	Preincubación	Control	Losartán	Captopril
ET-1	Valores de pD <sub>2</sub>	7.74±0.03	7.70±0.02	7.72±0.02
	Máxima respuesta	36.12±10.30	20.69±7.73	32.70±8.93
ET-1+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	8.09±0.06#	8.01±0.08#	8.10±0.04#
	Máxima respuesta	47.07±8.71#	41.3±9.24#	50.52±8.49#

Tabla 14.- Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán (10<sup>-5</sup> mol/L) y Captopril (10<sup>-5</sup> mol/L) sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por la ET-1, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en SHR viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \* p<0.05 vs Control, # p<0.05 vs ET-1 sin LNAME.

ADULTA	Preincubación	Control	Losartán	Captopril
U46619	Valores de pD <sub>2</sub>	7.57±0.04	6.88±0.03*	7.59±0.06
	Máxima respuesta	177.24±6.9	166.20±5.23	177.04±7.62
U46619+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	7.66±0.06	7.18±0.02*#	7.68±0.05
	Máxima respuesta	181.40±10.09	183.19±10.20	184.32±8.92

**Tabla 15.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán (10<sup>-5</sup> mol/L) y Captopril (10<sup>-5</sup> mol/L) sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por el U46619, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en SHR adultas. Los valores se expresaron como la media ± eem.  
\* p<0.05 vs Control, # p<0.05 vs U46619 sin LNAME.

VIEJA	Preincubación	Control	Losartán	Captopril
U46619	Valores de pD <sub>2</sub>	7.01±0.06	6.64±0.03*	6.99±0.05
	Máxima respuesta	173.49±5.89	162.20±5.23	171.64±8.76
U46619+LNAME	Valores de pD <sub>2</sub>	7.06±0.05	6.89±0.02*#	7.04±0.04
	Máxima respuesta	179.94±12.50	175.97±10.93	180.12±11.10

**Tabla 16.-** Efecto de la preincubación de los anillos aórticos con Losartán (10<sup>-5</sup> mol/L) y Captopril (10<sup>-5</sup> mol/L) sobre los valores de pD<sub>2</sub> y la contracción máxima (% de la respuesta a KCl 120mM) inducida por el U46619, en presencia o ausencia de LNAME (10<sup>-4</sup> mol/L), en SHR viejas. Los valores se expresaron como la media ± eem.  
\* p<0.05 vs Control, # p<0.05 vs U46619 sin LNAME.

*DISCUSSION*

---

## **1.- EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

### **1.1.- EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN LA SHR**

La edad se asocia a menudo con una prevalencia en el aumento de las cifras de PA y con una mayor severidad de la hipertensión arterial (Applegate, 1989; Frishman, 1991). En el presente trabajo las cifras de PAS no se ven modificadas significativamente con el envejecimiento en la SHR. De acuerdo con ésto, existen estudios previos donde tampoco se observan variaciones de este parámetro en SHR viejas de 70-72 semanas de edad cuando se compara con ratas adultas (Kung y Lüscher, 1995; Lang y cols., 1995). Este modelo de hipertensión en ratas desarrollado por Okamoto y Aoki entre 1959 y 1963 a partir de la cepa WKY presenta unas características genéticas específicas que determinan el establecimiento de unos niveles elevados de PA en el animal adulto. Este desarrollo espontáneo de la hipertensión en la SHR es diferente del que tiene lugar en otras cepas de ratas como las ratas hipertensas Dahl sensibles a la sal o las ratas hipertensas Sabra, que requieren la administración adicional de sal para el total establecimiento de la hipertensión. Las SHR desarrollan la hipertensión gradualmente, de forma que a las cinco o seis semanas de edad muestran unas cifras de PA ligeramente superiores que su control normotenso, la WKY. En la SHR joven los niveles de PA sigue incrementando progresivamente con la edad hasta que alrededor de las 14 semanas aproximadamente la hipertensión ya está plenamente establecida. Sin embargo, una vez que la hipertensión arterial se ha establecido en el animal adulto la edad no parece modificar sustancialmente la PA, ya que los niveles de PAS que presentan las SHR adultas y viejas son similares.

### **1.2.- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

El presente estudio también muestra que el tratamiento con Losartán y Captopril a una dosis de 10 mg/Kg/día y de 60 mg/Kg/día respectivamente, administrado en el agua de

bebida durante doce semanas, produce un descenso marcado de la PAS tanto en las SHR adultas como en las viejas, que fue comparable en los dos grupos de diferente edad. Estos resultados indicarían, por tanto, que la eficacia antihipertensiva de estos fármacos no se modifica con el envejecimiento en la SHR. En trabajos previos también se ha comprobado la efectividad del tratamiento con Losartán y otros antagonistas de los receptores  $AT_1$  de AII, así como con IECAs reduciendo las cifras de PA, no sólo en pacientes hipertensos y en ratas hipertensas jóvenes o adultas (Nelson y cols., 1992; Williams 1988; Cachofeiro y cols., 1995; Gillies y cols., 1997), sino también en pacientes y ratas hipertensas de edad avanzada (Israili y Hall, 1995; Nagano y cols., 1994; Nagura y cols., 1995).

El SRA juega un importante papel en la regulación de la PA, ya que la AII, su principal efector, es capaz de incrementar la PA por diversas vías, entre ellas fundamentalmente a través de su efecto vasoconstrictor directo sobre el músculo liso vascular y su acción directa sobre el túbulo estimulando la reabsorción de sodio y de agua en el riñón, pero también indirectamente a través de la estimulación del SNS y de factores vasoconstrictores endoteliales como la ET-1 y el  $TXA_2$ , y de la síntesis de aldosterona (Peach, 1977; Philips, 1987; Wong y cols., 1990; Dohi y cols., 1992; Manabe y cols., 1989). Todas estas acciones que ejerce la AII y que tienden a aumentar el tono vasomotor y la PA parecen estar mediadas por los receptores  $AT_1$ . A causa de estos efectos la AII ha sido implicada en la patogénesis de ciertas formas de hipertensión (Gavras y cols., 1974; Williams, 1988). Numerosos trabajos demuestran la elevada efectividad de los fármacos que interfieren con el SRA a diferentes niveles, como los inhibidores de la renina, los IECAs y los antagonistas no peptídicos de los receptores  $AT_1$  de AII, en la reducción de la PA en distintos tipos de hipertensión como en la SHR, tanto de forma aguda como crónica (Wood y cols., 1990; Bunkenburg y cols., 1991; Cachofeiro y cols., 1992; Cachofeiro y cols., 1995). Además ambos tipos de fármacos, los IECAs y los antagonistas de los receptores  $AT_1$ , son capaces de prevenir el desarrollo de la hipertensión en la SHR y en la SHR *stroke-prone* cuando son tratadas a temprana edad o desde el nacimiento (Oddie y cols., 1992; Clozel y cols., 1990; Lee y cols., 1991; Gohlke y cols., 1992; Gohlke y cols., 1993; Gillies y cols., 1997; Gohlke y cols., 1996). Esto sugiere la participación del SRA tanto en el mantenimiento como en el desarrollo de la hipertensión en este modelo experimental. Sin embargo, la SHR no presenta una mayor actividad de la renina plasmática ni un incremento

en los niveles de AII circulante respecto a la rata WKY (Williams, 1988; Trippodo y Frohlich, 1981), aunque si desarrolla una hiperreactividad renal a la AII que está mediada por los receptores  $AT_1$  (Kost y cols., 1993). Se ha propuesto que esta mayor sensibilidad del riñón a la AII podría estar participando en el desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión en la SHR. Asimismo se ha descrito que la densidad de receptores  $AT_1$  es más alta en la médula renal, en la corteza adrenal y en el corazón en las SHR que en las WKY de la misma edad, indicando que la expresión de los receptores  $AT_1$  está diferencialmente regulada en algunos órganos diana importantes de las acciones de la AII en la SHR y la WKY, y que esta alteración en la regulación de los receptores de AII podría ser relevante para las características fisiopatológicas de este modelo de hipertensión (Song y cols., 1995). También puede haber un incremento en la expresión de los receptores  $AT_1$  en algunas áreas del cerebro con importancia cardioreguladora que se ha implicado en la hiperactividad del SRA en el SNC de la SHR, así como en el desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión en estos animales (Schelling y cols., 1980). De igual modo, en ciertos territorios vasculares como en arterias mesentéricas de resistencia se ha observado un incremento en la densidad tanto de receptores  $AT_1$  como de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en SHR jóvenes prehipertensas que podría jugar un papel en el aumento de las resistencias vasculares periféricas y el desarrollo de altas presiones en este modelo experimental (Schiffirin y cols., 1984).

También se ha sugerido la participación de los SRA tisulares para explicar la respuesta depresora que produce la inhibición del SRA con IECAs o con antagonistas de los receptores  $AT_1$  en la SHR, a pesar de existir unos niveles normales de renina y AII circulante, y se ha postulado que estos SRA locales podrían tener cierta importancia en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión en la SHR. La presencia de SRA tisulares se ha demostrado en órganos como el riñón, corazón, vasos y SNC (Samani y cols., 1988; Rosenthal y cols., 1984), que intervienen en el control de la regulación de la PA y que son a su vez órganos diana importantes de las acciones de la AII. Varios investigadores han descrito la existencia de elevados niveles de renina vascular y adrenal en la SHR (Asaad y Antonaccio, 1982; Naruse y cols., 1981). Así, una estimulada síntesis de AII local puede resultar en un incremento de las respuestas mediadas por éste péptido, como un aumento del tono vascular, independientemente de la influencia de la AII circulante. Schelling y cols., también observaron un incremento de los niveles del SRA en ciertas regiones del cerebro



de la SHR, y se ha sugerido que estas vías angiotensinérgicas tisulares a nivel central pueden estar estimuladas en la SHR respecto a la WKY (Rowland y cols., 1995). Todos estos datos parecen apoyar la hipótesis de que una incrementada actividad de los SRA locales y de la producción de AII tisular en las SHR es al menos uno de los mecanismos que pueden ser responsables para el desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión.

Por otro lado, el hecho de que tanto los IECAs como Losartán sean efectivos reduciendo la PA no sólo en modelos de hiperetensión dependientes de renina o de AII, sino también en formas de hipertensión que están menos claramente relacionadas con una elevación de la actividad del SRA circulante, como en la SHR o en la hipertensión esencial en humanos (Williams, 1988; Cachofeiro y cols., 1995; Smith y cols., 1992; Nelson y cols., 1992) hace pensar también en la existencia de otros mecanismos adicionales que pudieran contribuir al efecto antihipertensivo de éstos fármacos. En el caso de los IECAs su efecto antihipertensivo se ha atribuido principalmente a la disminución de la formación de AII en plasma y en tejidos (Dzau, 1990), pero también a una acumulación del vasodilatador endógeno, Bk (Carretero y cols., 1981), ya que la ECA cataliza tanto la conversión de AI a AII como la degradación de Bk y kininas relacionadas (Erdős, 1990). Losartán bloquea los receptores  $AT_1$  de la AII que median todas las acciones biológicas bien conocidas de la AII (Timmermans y cols., 1993) como las que ejerce sobre la PA, por lo tanto, su efecto antihipertensivo es atribuido al bloqueo de cualquiera de las interacciones entre la AII y sus receptores  $AT_1$ . Sin embargo, Ohlstein y cols. (1992) observaron que Losartán puede inducir un prolongado efecto antihipertensivo en ratas a pesar de presentar una respuesta a AI y AII intacta, sugiriendo que Losartán podría disminuir la PA también a través de otros mecanismos distintos del antagonismo de los receptor  $AT_1$ .

De esta forma, parecen existir mecanismos adicionales implicados en la acción hipotensiva de ambos fármacos. Se ha descrito que el pretratamiento con un inhibidor de la síntesis de NO y con un inhibidor de la síntesis de PGs reduce el efecto antihipertensivo inducido por Captopril, Ramipril y Losartán en la SHR (Cachofeiro y cols., 1992; Cachofeiro y cols., 1995). Esto indica que el NO y las PGs podrían mediar al menos en parte el efecto hipotensor de estos fármacos. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que el efecto antihipertensivo del tratamiento con Losartán y Captopril esté asociado con un

aumento de los niveles de nitratos y nitritos plasmáticos en nuestro estudio. También se ha encontrado un aumento de los niveles de GMPc, el mediador intracelular del NO, en aorta de la SHR y de la SHR *stroke-prone* durante el tratamiento crónico con Losartán y con IECAs (Gohlke y cols., 1993; Goehlke y cols., 1996). En el caso de los IECAs un aumento en la disponibilidad de kininas puede estimular la síntesis de NO y PGs (Wiemer y cols., 1991). También los receptores AT<sub>2</sub> de AII han sido implicados en las acciones de Losartán en la SHR (Muñoz-García y cols., 1995) ya que durante el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>, la AII libre podría unirse a los receptores AT<sub>2</sub> no bloqueados, estimulando la síntesis de NO (Wiemer y cols., 1993; Seyedi y cols., 1995) y PGs (Jaiswal y cols., 1991). Además parte de los efectos de los IECAs y de Losartán también podrían estar relacionados con otros componentes del SRA distintos de la AII, como la A(1-7) que se genera endógenamente a partir de la AI y de la AII, y cuya producción se ha visto estimulada durante el tratamiento con IECAs y con Losartán (Kohara y cols., 1993; Luque y cols., 1996; Iyer y cols., 1998) y que también puede inducir la liberación de NO (Porsti y cols., 1994; Brosnihan y cols., 1996) y PGs (Jaiswal y cols., 1992; Hilchey y Bell-Quilley, 1995). De acuerdo con esta hipótesis se ha demostrado que la A(1-7) puede participar en las acciones de los fármacos que bloquean el SRA, ya que la inhibición de su formación revierte parcialmente el efecto antihipertensivo de la terapia combinada con Losartán y Lisinopril en la SHR (Iyer y cols., 1998).

Resumiendo, parece que el envejecimiento no modifica la PAS ni la acción antihipertensiva de Losartán y Captopril en la SHR. Asimismo, el efecto antihipertensivo que producen ambos fármacos en la SHR, aunque el SRA circulante no se encuentra activado en estos animales, sugiere que podría haber una estimulación del sistema a nivel de receptor y/o a nivel local en distintos tejidos, y pone de manifiesto también la importancia de la AII y de sus interrelaciones con otros sistemas vasoactivos en la regulación de la PA, así como su participación en el mantenimiento de la hipertensión en este modelo experimental.

## **2.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

### **2.1.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LA SHR**

Numerosos trabajos evidencian que la edad está asociada con alteraciones estructurales del sistema cardiovascular, como la hipertrofia del ventriculo izquierdo y el aumento de grosor de la pared arterial (Michel y cols., 1994; Haudenschild y Chobanian, 1984). Estas modificaciones estructurales asociados con el envejecimiento pueden ocurrir en animales cuyos niveles de PA están dentro de un rango de normotensión, aunque las alteraciones relacionadas con la edad parecen ser menores que aquellas asociadas con la hipertensión (Haudenschild y cols., 1981) y algunas de ellas incluso parecen ser independientes de la PA, como el incremento de la rigidez de la pared arterial que se produce con la edad (Michel y cols., 1994; Wolinsky, 1972). En nuestro estudio, corroborando los datos previos publicados en la literatura también se observa un incremento del peso del corazón y los anillos aórticos en las SHR viejas comparado con las adultas. Esto indicaría que el envejecimiento produce una hipertrofia cardíaca y aórtica en estos animales. *En pacientes hipertensos ancianos también aparece frecuentemente hipertrofia ventricular, especialmente en aquellos que presentan cifras de PAS más elevadas y con una mayor duración de la hipertensión en el tiempo (Oliner y cols., 1993).*

También hay un gran número de estudios que demuestran que existe una asociación entre la hipertensión y hipertrofia cardíaca y vascular (Roman y cols., 1992; Hughes y cols., 1993; Girerd y cols., 1994; Roman y cols., 1995; Chevalier y cols., 1995; Haudenschild y Chobanian, 1984). Se sabe que la sobrecarga dinámica como consecuencia de la hipertensión, es el principal factor mecánico que afecta al miocardio por lo que se considera que el crecimiento miocárdico en respuesta a una PA elevada es un proceso adaptativo (komuro y Yazaki, 1993). También es un hecho conocido que la estructura de los vasos sanguíneos puede ser remodelada por factores mecánicos relacionados con los cambios del flujo sanguíneo a través de los vasos, ya que el estres hemodinámico de la pared arterial en

la hipertensión es uno de los principales factores que afectan a la estructura vascular (Mulvany y Aalkjaer, 1990). Como consecuencia de la presión ejercida y por el rozamiento producido por el flujo sanguíneo sobre el endotelio se pueden producir alteraciones de la permeabilidad, forma, densidad y velocidad de replicación de las células endoteliales (De Chastonay y cols., 1983). De hecho las células endoteliales sometidas a presiones elevadas son más voluminosas y tienen una menor uniformidad en tamaño y forma que las células sometidas a presiones normales. De la misma manera ocurren importantes adaptaciones de la pared vascular que implican la proliferación de la capa media y la síntesis de elastina durante un incremento del flujo mantenido (Langille, 1993). Además, el estrés mecánico de la pared no sólo afecta al grosor arterial (Mulvany y Aalkjaer, 1990; Langille, 1993) sino que esta relación presión-grosor arterial también parece formar parte de un mecanismo de retroalimentación que contribuye a mantener un constante estrés en la pared arterial (Folkow, 1990) que a su vez conduciría al aumento de las modificaciones estructurales.

De acuerdo con esto se ha descrito que una de las características de la SHR es que además de hipertensión, presenta hipertrofia cardiovascular (Haudenschild y Chobanian, 1984; Chevalier y cols., 1995; Kaneko y cols., 1996). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que muchas de las alteraciones estructurales del sistema cardiovascular preceden a la presencia de elevados niveles de PA en este modelo de hipertensión. Así, la hipertrofia cardíaca (Weiss y Lundgren, 1978; Gray., 1984; Hallbäck-Nordlander, 1980), también como la hipertrofia e hiperplasia vascular (Olivetti y cols., 1982; Lee y cols., 1987; Rizzoni y cols., 1994) se empiezan a producir antes de que se manifieste la hipertensión en estos animales. Se ha detectado un mayor peso del ventrículo izquierdo (Weiss y Lundgren, 1978) y del ventrículo derecho (Hallbäck-Nordlander, 1980) en las SHR que en las WKY, así como una hipertrofia arterial (Eccleston-Joyner y Gray, 1988; Olivetti y cols., 1982) ya a temprana edad e incluso desde el nacimiento, sugiriendo la existencia de diferencias genéticas en el crecimiento miocárdico y vascular entre las SHR y las WKY. A las 4 semanas de edad, sin diferencias en la PA ya se encuentra un mayor grosor de la media y un incremento de la proporción media/lumen de las arterias mesentéricas de resistencia en la SHR que en la WKY (Rizzoni y cols., 1994). Las células musculares lisas vasculares de las SHR además son generalmente más grandes que las de las WKY y el porcentaje de células musculares multinucleadas es mayor en la SHR que en la WKY, siendo mayor la

incidencia de poliploidía ya desde las 4 semanas de edad (Lee y cols., 1992). Por tanto, parece que la hipertrofia cardiovascular no sólo está asociada a altas presiones, sino que también parecen existir mecanismos independientes de la PA implicados en su desarrollo.

Varios estudios ponen de manifiesto la existencia de marcadas similitudes en los cambios de la pared arterial relacionados con la edad y con la hipertensión, por lo que se ha sugerido que la hipertensión podría ser considerada como un proceso patológico de envejecimiento prematuro de los vasos sanguíneos. El engrosamiento de la íntima es una de las consecuencias comunes en ambas condiciones y aparece asociada con fenómenos de proliferación, una mayor riqueza en colágeno y con cambios en los componentes celulares y extracelulares de la pared arterial, (Gerrity y Cliff, 1972; Haudenschild y cols., 1981; Haudenschild y Chobanian, 1984; Michel y cols., 1994). La adherencia de células sanguíneas como plaquetas y monocitos a la íntima también se encuentra estimulada con la hipertensión y con la edad (Hollenberg y cols., 1974; Wei, 1992; Haudenschild y cols., 1981; Haudenschild y Chobanian, 1984) así como la acumulación de células en el espacio subendotelial cuyo origen parecen ser células mononucleares de la sangre y del músculo liso vascular. Además un incremento de la permeabilidad endotelial también podría favorecer la entrada de macromoléculas del plasma al espacio subendotelial (Belmin y cols., 1993). También son características típicas de la hipertensión y la edad el engrosamiento de la túnica media, principalmente debido a la hipertrofia de las células musculares lisas, y a la acumulación de colágeno en la pared arterial (Wolinsky., 1971; Michel y cols., 1994; Wolinsky, 1972; Belmin y cols., 1993). Por tanto, se podría sugerir que el incremento de la masa vascular total observada en nuestro estudio podría ser consecuencia principalmente de fenómenos de proliferación celular de la íntima y la media, aunque también pueden tener lugar otras modificaciones estructurales como el remodelado de la pared vascular producido por cambios en la composición y la organización de la matriz extracelular asociados con la edad (Michel y cols., 1994) y la hipertensión (Baumbach y Heistad, 1989; Heagerty y cols., 1993).

## 2.2.- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LA MASA CARDIACA Y AORTICA EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS

En este trabajo se observa que la administración de Losartán y Captopril durante doce semanas reduce la masa cardíaca y aórtica en las SHR de 6 y 24 meses de edad y que el tratamiento con ambos fármacos previene el aumento de la hipertrofia cardiovascular que se produce con la edad. Apoyando estos resultados, se ha publicado que el tratamiento crónico con Losartán a una dosis de 10 mg/Kg/día como la utilizada en nuestro estudio, y a dosis mayores, produce una reducción significativa de la masa ventricular izquierda (Kaneko y cols., 1996; Nishimura y cols., 1995), y de la hipertrofia en la aorta y en otros territorios vasculares en la SHR (Li y cols., 1997a; Nishimura y cols., 1995). El tratamiento con Captopril y en general con IECAs también disminuye tanto la hipertrofia y la fibrosis cardíaca (Nishimura y cols., 1995; Schoemaker y cols., 1994; Chevalier y cols., 1995), como la hipertrofia vascular en distintos tipos de arterias en la SHR (Nishimura y cols., 1995; Clozel y cols., 1989). Además, ambos fármacos administrados en el periodo prenatal o a las pocas semanas de edad son capaces de prevenir el desarrollo de la hipertrofia cardiovascular y de la hipertensión en la SHR y en la SHR *stroke-prone* (Oddie y cols., 1992; Clozel y cols., 1989; Lee y cols., 1991; Gohlke y cols., 1992; Gohlke y cols., 1993; Gohlke y cols., 1996) sugiriendo que el SRA podría tener un papel importante en el desarrollo de estas alteraciones en la SHR.

Es importante destacar que estos tratamientos que interfieren con el SRA no sólo tienen efectos sobre la estructura cardiovascular en modelos de hipertensión experimental como la SHR, la rata hipertensa Dalh sensible a la sal (Hayakawa y Raij, 1997), en la hipertensión inducida por la inhibición crónica de NO (Takemoto y cols., 1997), en la hipertensión renovascular (Wang y Prewitt, 1990) o en la hipertensión esencial en el hombre (Dun y cols., 1984) sino que también en ratas normotensas la administración de IECAs reduce el peso relativo del ventrículo izquierdo y del corazón (Azizi y cols., 1989; Kaneko y cols., 1996; Gillies y cols., 1997), así como el área media-íntima aórtica (Wang y Prewitt, 1990). Además como sucede en nuestro estudio el tratamiento con IECAs también disminuye los efectos de la edad sobre la hipertrofia del ventrículo izquierdo y de la aorta tanto en las

SHR como en ratas normotensas de 24 meses de edad (Secchi y cols., 1994; Michel y cols., 1994).

La reducción de las elevadas cifras de PA, que es el principal factor mecánico inductor de los cambios en la estructura del sistema cardiovascular, parece ser uno de los mecanismos por los que el tratamiento antihipertensivo con éstos fármacos mejoraría la hipertrofia cardiovascular que presenta la SHR y que incrementa con el envejecimiento. Existen experimentos que confirmarían este hecho, ya que se ha demostrado que al igual que Losartán y los IECAs, el descenso de la PA producido por un  $\beta$ -bloqueante o por una combinación de clorotiazida, reserpina y hidralazina, que no depende de la inhibición del SRA, también tiene un efecto antihipertrófico sobre el corazón y la aorta de ratas SHR y disminuye las modificaciones estructurales relacionadas con la edad en las SHR y WKY (Benetos y cols., 1994; Haudenschild y chobanian, 1984). Sin embargo, el tratamiento con IECAs es más efectivo que la hidralazina, la dihidralazina o el propanolol reduciendo la hipertrofia cardiovascular en la SHR, a pesar de que todos los tratamientos consiguen disminuir los niveles de PA (Clozel y cols., 1989; Owens, 1987). En ratas normotensas el tratamiento con IECAs también es capaz de disminuir el peso relativo del ventrículo izquierdo, mientras que el atenolol no muestra ningún efecto, aún cuando ambos fármacos producen descensos similares de la PA (Azizi y cols., 1989). Además se ha observado que tanto Losartan como los IECAs revierten la hipertrofia cardíaca incluso en ausencia de disminuciones significativas de la PA, en el hombre (Konstam y cols., 1992) y en ratas con estenosis aórtica y en la SHR (Kromer y Riegger, 1988; Kaneko y cols., 1996), y la hipertrofia cardíaca y aórtica en las SHR viejas (Secchi y cols., 1994). Por tanto, la reducción de la PA no parece ser el único mecanismo implicado en los efectos beneficiosos de los fármacos que inhiben la AII sobre la hipertrofia cardiovascular.

La AII juega un papel clave en la homeostasis cardiovascular a través de su capacidad para regular el tono y el crecimiento del músculo liso vascular, ya que la AII además de ejercer una potente acción vasoconstrictora, es un importante promotor de la proliferación de las células musculares lisas (Heagerty, 1991; Hayoz y cols., 1993) actuando como un factor de crecimiento (Lever y cols., 1992) a través de la estimulación de la síntesis proteica (Thollon y cols., 1989). De igual modo, la AII ejerce una función trófica

sobre los cardiomiocitos aumentando la expresión de protooncogenes que estimulan la síntesis de proteínas (Neyses y cols., 1993) y es capaz de estimular la síntesis de colágeno por los fibroblastos cardíacos (Kawaguchi y Kitabatake, 1996). La AII también puede alterar la composición de la matriz extracelular a través de la estimulación de la síntesis y secreción de glicoproteínas (Hahn, 1993; Himeno y cols., 1994). Por tanto, la AII podría inducir la hipertrofia y las alteraciones estructurales cardiovasculares, como consecuencia no sólo de sus efectos hemodinámicos sino también de sus efectos directos sobre la proliferación y la composición de la pared arterial y el miocardio.

De acuerdo con esto, Black y cols. (1995) proponen que la AII puede estimular directamente la hipertrofia cardíaca y la hipertrofia de la túnica media de la aorta y de las arteriolas mesentéricas de primer orden en la SHR independientemente de sus efectos sobre la PA. La infusión de AII produce hipertrofia cardíaca en ratas (Dostal y Baker, 1992) pero también induce directamente la hipertrofia de los cardiomiocitos *in vitro* (Sadoshima y Izumo, 1993) y la proliferación de células musculares lisas aórticas cultivadas (Bunkerburg y cols., 1992) y todos estos efectos proliferativos de la AII parecen estar mediados a través de los receptores  $AT_1$ , ya que Losartán es capaz de bloquearlos (Dostal y Baker, 1992; Sadoshima y Izumo, 1993; Bunkerburg y cols., 1992). Losartán también inhibe el incremento en la acumulación proteica inducido por la AII en miocitos aislados de rata (Murphy y cols., 1992). Además, de sus efectos directos, la AII podría mediar las acciones de otros vasoconstrictores sobre la hipertrofia y la estructura cardiovascular, como la ET-1 o los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Farivar y cols., 1995). Este efecto facilitador de la AII también estaría relacionado con los receptores  $AT_1$ , ya que el tratamiento con Losartán y Tandolapril reduce los efectos fibroproliferativos e hipertróficos de la FE en el corazón de ratas (Farivar y cols., 1995).

Bunkerburg y cols. (1992) observaron que los efectos proliferativos inducidos por la AII estaban incrementados en las células musculares lisas aórticas de las SHR comparado con la WKY y que eran mediados por los receptores  $AT_1$ , además la afinidad del receptor  $AT_1$  por su ligando y la densidad de receptores tendía a ser mayor en las células de las SHR que en las WKY, lo que podría contribuir a explicar su mayor efecto proliferativo en las SHR. También el incremento del calcio libre citosólico inducido por la AII, así como las



uniones de la A II a su receptor estaban incrementadas en los cardiomiocitos de las SHR respecto a las WKY (Touyz y cols., 1996). De la misma forma, en el presente trabajo las SHR viejas presentaban una mayor respuesta a la AII en anillos aórticos que las adultas, lo que también podría reflejarse en un aumento de sus efectos proliferativos y en una mayor hipertrofia cardiovascular con el envejecimiento. Así, Losartán y Captopril inhibiendo la AII, reducirían sus acciones sobre la pared arterial y el miocardio, mejorando la hipertrofia cardiovascular y previniendo su aumento con el envejecimiento.

La inhibición de los efectos proliferativos de la AII, sin embargo, no parece ser el único mecanismo no dependiente de la PA por el que Losartán y Captopril podrían reducir la hipertrofia cardiovascular, ya que no sólo el SRA, sino que también alteraciones del eje L-arginina/NO, que constituye el principal sistema vasodilatador y antiproliferativo que antagoniza las acciones de la AII, parecen estar implicadas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca en la SHR. Matsuoka y cols. (1996) encontraron que el contenido cardíaco de GMPc así como de nitratos y nitritos en las SHR era menor que en las WKY y que la administración crónica de L-arginina no sólo incrementaba estos niveles sino que también atenuaba la hipertrofia cardíaca en estos animales, independientemente de la PA. Por tanto, el incremento de los niveles de nitritos y nitratos plasmáticos que se produce durante el tratamiento con Losartán y Captopril podría sugerir también que un aumento de la producción o disponibilidad de NO podría ser otro de los mecanismos por los que ambos tratamientos mejoran la hipertrofia cardiovascular.

Los cambios estructurales de la pared arterial que ocurren con la edad y la hipertensión pueden contribuir a las anomalías de la función arterial observadas durante el envejecimiento en estos animales. Por tanto, no sólo los efectos beneficiosos de la administración crónica de Losartán y Captopril sobre la PA, sino también sobre la morfología y la composición de la pared vascular, podrían contribuir en la mejora de la disfunción endotelial en la SHR y a normalizar algunas de las alteraciones de la función vascular asociadas con el envejecimiento.

### **3.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA SHR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

#### **3.1.- EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LA SHR**

##### **3.1.1.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta vasoconstrictora**

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que la vasoconstricción inducida por altas concentraciones de KCl en anillos aórticos de las SHR de 24 meses estaba reducida cuando se comparaba con la obtenida en las ratas de 6 meses de edad. De forma similar, otros autores también encuentran una disminución de la respuesta inducida por KCl con la edad en aorta de ratas normotensas (Küng y Lüscher, 1995; Cohen y Berkowitz, 1976; Wanstall y O'Donnell, 1989) y en aorta y arterias mesentéricas de SHR (Küng y Lüscher, 1995; Lang y cols., 1995). De acuerdo con estos resultados, parece que el envejecimiento está asociado con una reducción de la respuesta del músculo liso vascular a KCl. Teniendo en cuenta que la contracción a KCl es independiente de la activación de receptores, una reducción en su respuesta sugeriría que los mecanismos contractiles de las células musculares del vaso serían menos eficaces con la edad.

La acción vasoconstrictora del KCl está mediada por la despolarización de la membrana celular (Fleming, 1987) que conduce a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje localizados en la membrana, por lo que este tipo de contracción depende principalmente de la entrada de calcio a través de estos canales y en menor proporción de la liberación del calcio almacenado en los depósitos intracelulares (Karakı y Weiss, 1988). Considerando este hecho, se podría proponer que el envejecimiento podría atenuar la entrada de calcio en la célula del músculo liso vascular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje. Apoyando esta idea, se ha demostrado que no sólo está reducida la contracción inducida por KCl, sino también a otros agentes que producen la entrada de calcio a través de dichos canales como el  $\text{CaCl}_2$ , y el activador de canales de calcio, Bay K8644, en la aorta de ratas viejas. Sin embargo, otros agentes que no actúan a

través de ellos, como la cafeína, que libera el calcio intracelular y el ionóforo de calcio A23187, que transporta calcio dentro de la célula por canales no específicos, no presentan diferencias en su respuesta entre ratas jóvenes y viejas (Wanstall y O'Donnell, 1989). Por tanto, esta reducción de la contracción a KCl dependiente de la edad podría reflejar cambios en los canales de calcio dependientes de voltaje como por ejemplo alteraciones de las proporciones relativas de canales en estado activo, de reposo o inactivo y/o de sus propiedades para unirse al calcio.

Otra posibilidad que también se ha sugerido para explicar la menor respuesta a KCl en la aorta de ratas viejas es que el potencial de membrana en reposo se encontraría más negativo o hiperpolarizado que en la aorta de ratas jóvenes (Wanstall y O'Donnell, 1989). La contracción a KCl está determinada en gran medida por el potencial de membrana (Fleming, 1987), pero también la sensibilidad al calcio o al activador de canales de calcio, Bay K8644, depende de la concentración de  $K^+$  (Su y cols., 1984), por lo que sus respuestas se podrían ver alteradas por modificaciones en este potencial de membrana.

Como ya se ha discutido previamente en el apartado 2.1, la hipertensión y el envejecimiento se asocian con cambios en la estructura del músculo liso vascular que se reflejan entre otras modificaciones en un incremento del grosor de la túnica media. Estas alteraciones estructurales podrían estar afectando a la funcionalidad de las células del músculo liso vascular, conduciendo a una pérdida de su capacidad contráctil. Se podría proponer entonces que el empeoramiento de la respuesta contráctil del músculo liso con la edad en la SHR, podría ser consecuencia también de las modificaciones estructurales que ocurren durante la evolución de la hipertensión y que van incrementando con el envejecimiento, como sugiere la mayor hipertrofia vascular que presentan estos animales con la edad.

Asimismo, nuestro estudio demuestra que en la SHR las consecuencias del envejecimiento sobre la respuesta constrictora mediada por receptor no son homogéneas, sino que se producen alteraciones específicas de las respuestas a determinados vasoconstrictores. De esta forma, el envejecimiento conduce a una disminución de la contracción inducida por factores constrictores derivados del endotelio como la ET-1, o el

análogo del TXA<sub>2</sub>, el U46619, así como de la contracción dependiente de endotelio a la Ach+LNAME, mientras que produce un incremento de la respuesta inducida por vasoconstrictores de acción sistémica, como la AII y el agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, FE. La información recopilada hasta el momento sobre los efectos del envejecimiento en la contracción a ET-1 parece indicar que en la mayoría de los casos existe una disminución de la respuesta contráctil inducida por la ET-1 con la edad. Esto se ha observado en aorta (Filippelli y cols., 1993; Küng y Lüscher, 1995) y en arterias mesentéricas (Dohi y Lüscher, 1990; Dohi y Lüscher, 1991; Lüscher y cols., 1992b) de ratas normotensas e hipertensas. También se ha observado que la edad disminuye la contracción inducida por el U46619, un agonista de los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, en aorta y en arterias mesentéricas de las SHR, pero que su respuesta no se ve modificada en las WKY (Küng y Lüscher, 1995; Lang y cols., 1995). De manera similar, en nuestro estudio tanto la contracción a ET-1 como al U46619, se encuentran reducidas con el envejecimiento en la SHR, corroborando así los datos previos encontrados en la literatura.

La contracción dependiente de endotelio a la Ach incrementa con la edad en la aorta de ratas normotensas (Küng y Lüscher, 1995; Koga y cols., 1989). Sin embargo, nuestros resultados indican que en la SHR la respuesta a la Ach+LNAME, al contrario de lo que ocurre en ratas normotensas, disminuye claramente durante el envejecimiento. Este efecto también se describe en la literatura (Küng y Lüscher, 1995). Numerosos estudios demuestran que el principal factor vasoconstrictor endotelial, EDCF, estimulado por la Ach es un derivado prostanoide de la COO, puesto que la respuesta constrictora inducida por la Ach se bloquea con indometacina (Lüscher y Vanhoutte, 1986; Taddei y cols., 1993b; Auch-Schwelk y cols., 1992; Koga y cols., 1988; Koga y cols., 1989). Además, la presencia de antagonistas del receptor TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> también previene la contracción a la Ach+LNAME en la SHR y en la WKY (Küng y Lüscher, 1995; Kato y cols., 1990), indicando que podría tratarse del TXA<sub>2</sub> y/o de la PGH<sub>2</sub> cuyas respuestas están mediadas por los mismos receptores. Teniendo en cuenta esto, se puede sugerir que el envejecimiento disminuye la respuesta a los agonistas de los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, ya que tanto la contracción del análogo del TXA<sub>2</sub>, U46619, como la contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach están reducidas en las SHR viejas cuando se compara con las ratas adultas.

Esta disminución de la respuesta inducida por la ET-1, el U46619, y la Ach+LNAME que se produce con el envejecimiento podría ser debida a una regulación negativa de los receptores de ET y de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> del músculo liso vascular. De hecho se ha demostrado que existe una menor densidad de receptores de ET con la edad (Schiffrin y cols., 1995). Asimismo, parece haber una reducción de la sensibilidad a estos agentes durante el envejecimiento, ya que se observa una disminución en los valores de pD<sub>2</sub> para la ET-1 y el U46619 en los anillos aórticos de las SHR viejas respecto a las adultas. Tanto la hipertensión como la edad se han asociado con un aumento de los niveles plasmáticos de ET-1 en humanos (Saito y cols., 1990; Miyauchi y cols., 1992; Knothe y cols., 1992). También en la SHR se ha encontrado un aumento de la concentración de ET-1 en plasma (Larivière y cols., 1993) y un incremento de los niveles de TXA<sub>2</sub> en aorta y riñón respecto a su control normotenso, la WKY (Ishimitsu y cols., 1988a,b; Konieczkowski y cols., 1983; Purkerson y cols., 1986). Así, una estimulación de la producción y/o liberación de estos factores endoteliales, ET-1 y TXA<sub>2</sub> y/o PGH<sub>2</sub>, como se ha sugerido que ocurre en la SHR (Lüscher y Vanhoutte, 1986; Dohi y Lüscher, 1990; Tesfamariam y Ogletree, 1995), mantenida en el tiempo podría conducir a una disminución del número y/o de la actividad de los receptores de ET (Masaki y cols., 1993; Hirata y cols., 1988) y de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> del músculo liso vascular. Podría proponerse, por tanto, que el envejecimiento produciría una pérdida progresiva de respuesta a los factores vasoconstrictores derivados del endotelio como consecuencia de una situación prolongada de elevada liberación de estos factores en la SHR.

Es un hecho bien conocido que los niveles de NA en plasma incrementan con la edad en el hombre y que este incremento es mayor en sujetos normotensos que en hipertensos (Goldstein y cols., 1983; Elser y cols., 1981; Dutka y cols., 1995). Aunque no está tan claro lo que ocurre con la respuesta adrenérgica durante el envejecimiento, en general parece que las respuestas mediadas por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en el hombre están bien preservadas, con un número y una afinidad de los receptores normal (Docherty, 1990; Scott y Reid, 1982; Buhler y cols., 1980) mientras que las respuestas mediadas por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se ven atenuadas tanto a nivel pre como postsináptico (Docherty, 1990; Hyland y Docherty, 1985) o no sufren variaciones con la edad (Featherstone y cols., 1987). Sin embargo, los numerosos resultados de los que se dispone actualmente sobre el efecto de la edad en la respuesta a NA y en general a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos como la FE en

animales de experimentación como la rata o el conejo son contradictorios, observándose un incremento de la contracción a estos agentes (Moritoki y cols., 1986; Dohi y cols., 1990; Duckles, 1983) pero también una respuesta reducida (Filippelli y cols., 1993; Wanstall y O'Donnell, 1988; Cohen y Berkowitz, 1976; Feletou y cols., 1993; Atkinson y cols., 1994a; Owen, 1986) o no modificada (Duckles y cols., 1985; Atkinson y cols., 1994b; Kung y Lüscher, 1995; Lang y cols., 1995; Hayashi y Toda, 1978; Dohi y Lüscher, 1990; Taberero y Vila, 1995).

A diferencia de lo que se observa con la NA, los niveles plasmáticos de AII en el hombre no se modifican o disminuyen ligeramente durante el envejecimiento (Duggan y cols., 1992; Dutka y cols., 1995; Nagano y cols., 1994). La respuesta vasoconstrictora a AII (Hogikyan y Supino, 1994), así como la afinidad por su receptor tampoco parecen verse alteradas en el hombre, mientras que la densidad de receptores de AII en plaquetas humanas incrementa con la edad (Duggan y cols., 1992). Con la respuesta a AII en animales de experimentación ocurre algo similar a lo descrito para la respuesta adrenérgica, ya que los datos publicados hasta el momento son variados y a veces opuestos. Algunos autores no han encontrado alteraciones de la respuesta a AII con la edad en diferentes arterias de distintos animales (Hynes y Duckles, 1987; Toda y cols., 1986a; Toda y Shimizu, 1987; Lang y cols., 1995) pero también se ha observado una reducción de su respuesta en aorta de rata (Wakabayashi y cols., 1990), y un incremento de la reactividad vascular renal a este péptido en ratas con el envejecimiento (Tank y cols., 1994).

La mayoría de los trabajos de investigación realizados, sin embargo, se han llevado a cabo en animales normotensos y parece que los efectos del envejecimiento en éstos y en animales hipertensos no son paralelos y no siempre tienen las mismas consecuencias sobre la función vascular. Además las diferencias en el territorio vascular y en la edad de los animales utilizados en los distintos estudios suponen también un factor de divergencia importante para explicar la disparidad de resultados encontrados. Así, según nuestros datos el incremento en la respuesta a FE y AII parece observarse en la aorta de las SHR de edad avanzada, ya que en SHR un poco más jóvenes, de 70-72 semanas de edad, no se han encontrado modificaciones de la respuesta a NA (Kung y Lüscher, 1995; Lang y cols., 1995) y a AII (Lang y cols., 1995) respecto a la de ratas adultas, aunque si existe ya una

incrementada respuesta a AI y una mayor actividad ECA en arterias mesentéricas de SHR de esta misma edad (Lang y cols., 1995) comparado con las adultas.

En resumen, estos resultados sugieren que las respuestas inducidas por vasoconstrictores derivados del endotelio están reducidas con el envejecimiento, mientras que aquellas respuestas inducidas por agentes vasoconstrictores independientes de endotelio están incrementadas en las SHR de 24 meses de edad. Aunque nuestro estudio no permite clarificar las causas de este efecto diferencial del envejecimiento sobre la respuesta vasoconstrictora dependiente e independiente de endotelio en la SHR, podría proponerse que el incremento en la contracción a FE y a AII en estos animales podría tener lugar como una respuesta adaptativa para contrarrestar la pérdida de capacidad contráctil del músculo liso y la reducción de la respuesta a los factores constrictores derivados del endotelio, puesto que parece que estas alteraciones ocurren primero en el tiempo y se han observado ya en SHR de 70-72 semanas donde la respuesta a NA y AII todavía no estaban modificadas (Küng y Lüscher, 1995; Lang y cols., 1995).

### **3.1.2.- Efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora en el envejecimiento**

Una de las principales funciones del endotelio vascular es actuar como una barrera protegiendo al músculo liso de una excesiva contracción, a través de la producción de factores endoteliales vasorrelajantes que modulan su respuesta contráctil. Así, un gran número de agentes vasoconstrictores, como la NA, la ET o la AII son capaces de estimular la liberación de NO en las células endoteliales, que puede de esta forma atenuar sus efectos directos sobre el músculo liso vascular (Furchgott y Vanhoutte, 1989). En este trabajo se observa que la preincubación de los anillos aórticos con el inhibidor de la síntesis de NO, LNAME, que no presenta efectos sobre el tono aórtico basal, es capaz de incrementar la contracción máxima y la sensibilidad a FE y a ET-1 tanto en las SHR adultas como en las viejas, demostrando el papel modulador que ejerce el NO sobre la respuesta inducida por estos agentes vasoconstrictores. También en arterias mesentéricas de rata la presencia del endotelio reduce la sensibilidad y la respuesta máxima a FE en la misma proporción que a NA (Dohi y cols., 1990; Lüscher y cols., 1992b) y este efecto puede ser en gran parte

prevenido por otro inhibidor de la síntesis de NO, el LNMMA (Dohi y cols., 1990). De igual modo, la eliminación del endotelio aumenta la sensibilidad a NA en aorta de rata (Tabernero y Vila, 1995) y en arterias pulmonar y carótida de cobaya, donde el LNMMA también aumenta la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica (Thompson y Weiner, 1993). Lo mismo ocurre con la contracción inducida por la ET-1, ya que la eliminación del endotelio en arterias mesentéricas (Dohi y Lüscher, 1990; Lüscher y cols., 1992b) y en arteria pulmonar de rata, así como la adición de LNAME en arterias pulmonares intactas (MacLean y cols., 1994) potencia la respuesta a ET-1.

El efecto del envejecimiento sobre la acción moduladora del endotelio en la contracción no está del todo claro, aunque algunos estudios apuntan a que podría haber una reducción de ésta con la edad, y una menor capacidad del NO para regular la respuesta constrictora. En lecho mesentérico y arterias mesentéricas de ratas normotensas el efecto inhibitor del endotelio sobre la contracción a NA y a ET-1 disminuye con la edad y la hipertensión (Atkinson y cols., 1994a; Atkinson y cols., 1994b; Dohi y cols., 1990; Dohi y Luscher., 1990; Dohi y Luscher, 1991; Lüscher y cols., 1992b). También se ha visto una reducción de la capacidad moduladora del endotelio en la contracción a NA y ET-1 en arterias de resistencia de SHR adultas cuando se compara con ratas jóvenes (Dohi y cols., 1990; Dohi y Luscher, 1991). Sin embargo, no se han encontrado diferencias en el aumento de la contracción a ET-1 inducido por la eliminación del endotelio en arterias mesentéricas entre ratas adultas y viejas (Dohi y Luscher., 1990) y se ha observado un mayor incremento de la sensibilidad a NA en presencia LNAME en arterias mesentéricas de SHR viejas que en adultas. Nuestros datos demuestran que el aumento de la contracción a FE y ET-1 inducido por el LNAME fue proporcionalmente semejante en los anillos aórticos de las SHR adultas y viejas, indicando que la participación del NO regulando la respuesta constrictora de estos agentes es similar en ambos grupos de edad y que no existe un empeoramiento de la acción moduladora del NO en las SHR viejas. Apoyando este hecho hay que mencionar que en el presente trabajo tampoco se han encontrado diferencias en los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos entre SHR adultas y viejas, sugiriendo que no parece haber una menor producción o disponibilidad de NO durante el envejecimiento.



El TXA<sub>2</sub> al igual que otros factores vasoconstrictores puede estimular la liberación de NO en las células endoteliales. Se ha demostrado que su análogo, el U46619 también podría estimular la liberación de dicho factor endotelial en la aorta de ratas normotensas, ya que la eliminación del endotelio, así como la adición del inhibidor del NO, oxyhemoglobina, en anillos intactos, aumenta su respuesta constrictora (Folger y cols., 1991). En los anillos aórticos de las SHR la presencia del LNAME en el medio de incubación no modificó significativamente la contracción inducida por el U46619 ni en las ratas adultas ni en las viejas. Por tanto, según estos resultados, parece que el NO no tendría un papel regulador importante sobre la contracción inducida por el análogo del TXA<sub>2</sub> en la aorta de las SHR en estas condiciones experimentales. Estas diferencias con lo descrito en ratas normotensas podrían ser interpretadas como una alteración más de la función endotelial que presenta la SHR, como se ha demostrado que ocurre con la relajación y contracción dependiente de endotelio (Küng y Lüscher, 1995; Lüscher y Vanhoutte, 1986; Dohi y Lüscher, 1990; Tesfamariam y Ogletree, 1995).

### **3.1.3.- Efectos del envejecimiento sobre la respuesta vasodilatadora**

El envejecimiento está relacionado con una reducción de la relajación dependiente de endotelio en distintos territorios vasculares y en respuesta a diferentes agonistas como la Ach (Fujii y cols., 1993; Koga y cols., 1988; Koga y cols., 1989; Tominaga y cols., 1994; Küng y Lüscher, 1995) la Bk, la histamina, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, y otros agentes vasodilatadores dependientes de endotelio (Moritoki y cols., 1986; Amerini y cols., 1994; Arribas y cols., 1994; Mayhan y cols., 1990; Katano y cols., 1993) en animales de experimentación como la rata y también en el hombre (Vita y cols., 1990; Egashira y cols., 1993; Taddei y cols., 1995). Confirmando este hecho, el presente trabajo demuestra que la edad disminuye la relajación inducida por la Ach en la aorta de la SHR.

Varios mecanismos pueden estar implicados en los efectos deletereos del envejecimiento sobre la respuesta vasodilatadora de la Ach en estos animales. Las modificaciones estructurales de la pared arterial que tienen lugar con la hipertensión y que van incrementando progresivamente con la edad, como se manifiesta en la mayor hipertrofia vascular que presentan las SHR viejas, podrían estar afectando a la funcionalidad de las

células endoteliales. El envejecimiento y la hipertensión producen un engrosamiento de la íntima relacionado con procesos de proliferación celular y un aumento de la acumulación de células en el espacio subendotelial como ya se ha mencionado en el apartado 2.1. Estas alteraciones estructurales podrían modificar la capacidad de las células endoteliales para sintetizar o liberar factores vasodilatadores y/o aumentar la distancia física que las separa del músculo liso, haciendo más difícil la acción de los mismos y contribuyendo al deterioro de la función endotelial con el envejecimiento.

La hipertensión, como el envejecimiento, está caracterizada por una disfunción endotelial que se manifiesta principalmente por una disminución de la relajación dependiente de endotelio (Panza y cols., 1990; Panza y cols., 1993; Küng y Lüscher, 1995). El endotelio es un órgano diana de la hipertensión ya que como consecuencia de su localización anatómica está expuesto a las fuerzas mecánicas del flujo sanguíneo. El principal mecanismo inductor y mediador de la disfunción endotelial hipertensiva es la PA elevada, responsable del incremento de las fuerzas de cizallamiento sobre las células endoteliales vasculares. Ello puede dar lugar no sólo a modificaciones estructurales, como ya se ha comentado previamente, sino también a alteraciones funcionales que afectarían a la producción o a la liberación de los distintos factores vasoactivos, así como a la respuesta de dichos agentes (Lüscher, 1990). Se ha propuesto que podría existir una disminución en la disponibilidad de NO que estaría implicada en la reducción de la relajación a Ach observada en pacientes hipertensos y en ratas hipertensas (Mayhan y cols., 1989; Docherty, 1990). Defectos en el proceso de transducción de la señal unida a la activación de la vía L-arginina/NO, cambios en la expresión de receptores muscarínicos o incluso modificaciones en la actividad de la colinesterasa podrían conducir a las anomalías de la función vascular en pacientes con hipertensión esencial (Taddei y cols., 1993b; Panza y cols., 1994). También se ha propuesto que en la hipertensión podría haber un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno que pueden inactivar el NO y contribuir de esta manera en las alteraciones de la función endotelial (Grunfeld y cols., 1995; Tschusdi y cols., 1996). Por tanto, se podría sugerir que la duración de la hipertensión podría empeorar más la relajación dependiente de endotelio al estimular las consecuencias de estos procesos ya alterados en la hipertensión.

Algunos estudios han sugerido que las alteraciones en la relajación dependiente de endotelio que se producen con el envejecimiento también podrían deberse a una menor síntesis de NO (Moritoki y cols., 1986; Barton y cols., 1997), y/o a una mayor producción de radicales libres de oxígeno, ya que hay un incremento del estrés oxidativo con la edad (Stadtman, 1993; Ames y Shigenaga, 1992). Nuestros resultados no parecen indicar que haya una menor producción de NO durante el envejecimiento en la SHR, puesto que en ambos grupos de edad los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos son comparables. De acuerdo con esto, tampoco se han encontrado diferencias en la actividad de la NOS en la aorta de la SHR con la edad (Chou y cols., 1998). Sin embargo, si podría haber un aumento de radicales libres y/o una disminución de la capacidad antioxidante, como una menor actividad de la superóxido dismutasa, en la aorta hipertrofiada de estos animales, como se ha demostrado que ocurre en el corazón hipertrofiado de las SHR con la edad (Ito y cols., 1995), que podría contribuir en la reducción de la respuesta a Ach con el envejecimiento. Por otro parte, se ha observado que además del NO, otros factores relajantes derivados del endotelio como el EDHF o la PGI<sub>2</sub>, también pueden estar implicados en el empeoramiento de la relajación a Ach con la edad. La hiperpolarización dependiente de endotelio producida por la Ach está reducida con el envejecimiento en arterias mesentéricas de SHR y de ratas normotensas (Fujii y cols., 1993; Nakashima y Vanhoutte., 1993), así como la síntesis de PGs (Tukunaga y cols., 1991) lo que podría contribuir a la disminución de la relajación a Ach observada.

Nuestros datos también demuestran que el envejecimiento reduce la relajación inducida por un dador exógeno de NO como el NPS. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha no encuentran cambios en la respuesta a nitrovasodilatadores con la edad en ratas, ya sea en arterias de conducción o de resistencia, (Tsujimoto y cols, 1986; Koga y cols., 1989; Mayhan y cols., 1990; Katano y cols., 1993; Tominaga y cols., 1994; Dohi y Luscher, 1990; Hajdu y cols., 1993) y en arteria braquial en el hombre (Celermajer y cols., 1994) e incluso en algunos casos se encuentra un incremento de ésta, como en la aorta de rata (Kung y Luscher, 1995). Similarmente a lo que se observa en nuestro estudio también algunos autores han encontrado una reducción en la respuesta a estos compuestos en lecho mesentérico y en la aorta de rata (Atkinson y cols., 1994b; Amerini y cols., 1994; Moritoki y cols., 1992) y de conejo (Chinellato y cols., 1991). Estas diferencias pueden ser atribuidas

a las distintas características de PA y edad de los animales utilizados en los diferentes estudios. En una edad avanzada, como son 24 meses en la SHR, parece haber un deterioro significativo de la relajación del músculo liso vascular a NPS. Este empeoramiento en la capacidad de respuesta del músculo liso al NO podría estar relacionado con las alteraciones estructurales que se producen en la túnica media durante la hipertensión y con el envejecimiento, que no sólo pueden conducir a una función contráctil anormal, sino también al deterioro de los mecanismos de relajación dependientes de GMPc. Tanto los agentes vasodilatadores dependientes de endotelio como los independientes de endotelio ejercen sus efectos a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble y la formación de GMPc en las células musculares lisas (Rapoport y cols., 1983). Como ambas respuestas relajantes, a la Ach y al NPS, aparecen reducidas en las SHR de 24 meses, podría sugerirse que no sólo las alteraciones de la función endotelial sino también del músculo liso vascular podrían contribuir a los efectos deletereos de la edad sobre la relajación inducida por la Ach en la aorta de las SHR.

Por último habría que mencionar que un incremento en la respuesta vasoconstrictora también podría participar en la reducción de la relajación inducida por la Ach y el NPS en las SHR viejas. Así, el aumento de la contracción a AII y FE que se produce con el envejecimiento podría antagonizar la respuesta relajante dependiente e independiente de endotelio en estos animales. En este sentido, se ha demostrado que la AII podría participar en el empeoramiento de la respuesta vasodilatadora, ya que la hipertensión inducida por la administración crónica de AII está asociada con una disminución de la relajación a Ach, a NPS y otros vasodilatadores independientes de endotelio (d'Uscio y cols., 1997; Rajagopalan y cols., 1996).

### **3.2.- CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO CRONICO CON LOSARTAN Y CAPTOPRIL SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

#### **3.2.1.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasoconstrictora**

La respuesta contráctil inducida por KCl en anillos aórticos de las SHR adultas y viejas tratadas con Losartán y Captopril durante doce semanas no se vio modificada cuando se comparaba con la obtenida en los animales que no recibieron tratamiento, lo que sugiere que estos fármacos no tienen efectos sobre la función contráctil del músculo liso vascular. En trabajos previos también se ha encontrado que la respuesta a KCl en aorta de SHR tratadas con Captopril era similar a la de los animales sin tratamiento (Antonaccio y cols., 1981). Al igual que Captopril, otros IECAs tampoco afectan a la respuesta inducida por altas concentraciones de K<sup>+</sup> en vasos aislados (Kuroda y cols., 1990) ni a la contracción inducida por CaCl<sub>2</sub> en aorta torácica de rata (Sekiguchi y cols., 1993). Asimismo, Losartán tampoco modificaba o incrementaba ligeramente la concentración intracelular de calcio libre en las células musculares lisas de rata (Burnier y cols., 1991; Ko y cols., 1992).

El tratamiento prolongado con Losartán y Captopril parece tener distintos efectos sobre la respuesta constrictora mediada por receptor, dependiendo de la edad de los animales. En el caso de la respuesta a AII, la administración crónica de Losartán disminuyó su respuesta, aunque la reducción observada fue mucho mayor en las SHR viejas que en las adultas. El tratamiento con otros antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de AII, como el CGP 48369 también disminuye la respuesta a AII en arterias mesentéricas de SHR (Dohi y cols., 1994). El mecanismo por el cuál se reduce la respuesta constrictora a la AII exógena en vasos aislados de las SHR tratadas crónicamente con antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de AII no está muy claro, pero parece indicar que su administración prolongada podría dar lugar a una regulación negativa de este tipo de receptores, responsables de la acción vasoconstrictora de la AII. Ello podría suponer una respuesta adaptativa frente al aumento mantenido de los niveles circulantes de AII que se produce durante el tratamiento con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub>, como se ha visto que ocurre en otras situaciones donde

existe un incremento de la concentración plasmática de AII. Así, una restricción de sodio en la dieta no sólo produce el aumento de los niveles de AII, sino que también disminuye la densidad de los receptores de AII en el músculo liso vascular de la rata (Gunther y cols., 1980). Por otro lado, el hecho de bloquear la unión de la AII a sus receptores  $AT_1$  también podría conducir a la eliminación de los mismos, al carecer de una respuesta biológica funcional. En las SHR viejas, donde la contracción a AII estaba incrementada respecto a las ratas adultas, el tratamiento crónico con Losartán reduce considerablemente esta respuesta, por lo que este mecanismo de regulación negativa de los receptores de AII podría estar potenciado en estas condiciones, teniendo una mayor repercusión con la edad.

Al contrario que Losartán, la administración prolongada de Captopril produjo un incremento significativo de la contracción inducida por la AII en anillos de aorta de las SHR adultas respecto a los animales que no recibieron tratamiento. En las SHR viejas tratadas con Captopril, sin embargo, la respuesta a AII fue comparable a la observada en los animales sin tratamiento de la misma edad. Estos efectos opuestos producidos por el tratamiento con Captopril y Losartán sobre la contracción a AII pueden ser atribuidos al distinto mecanismo de acción que presentan ambos fármacos. Así, el hecho de que la administración crónica de Captopril en las ratas adultas produzca una respuesta exagerada a la adición exógena de AII, podría interpretarse como un mecanismo de regulación fisiológico para compensar la caída en los niveles de AII circulantes producida por la inhibición continuada de la conversión de AI a AII a través de la ECA. De esta forma, se ejercería una regulación positiva de los receptores de AII bien aumentando su número o bien estimulando su actividad para poder así responder más eficazmente ante la menor disponibilidad de AII. En este sentido se ha demostrado que el tratamiento crónico prenatal y postnatal de las SHR con Captopril estimula la respuesta vascular renal a AII e incrementa su unión al receptor en las células musculares lisas aórticas de estos animales (Wilson y cols., 1988). También el tratamiento con Captopril produce un incremento del contenido cardíaco de ARNm de receptores  $AT_1$  en las SHR (Kitami y cols., 1992). En las SHR viejas, sin embargo, este mecanismo de regulación positiva de los receptores de AII no parece tener lugar, probablemente porque ya se encontraba estimulada su respuesta a AII antes del tratamiento.

La administración crónica de Losartán en las SHR de 24 meses de edad produjo también una disminución de la contracción a FE normalizando la respuesta exagerada que presentaban estos animales al agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico y produjo un ligero incremento de la contracción inducida por la ET-1, aunque no se llegaron a alcanzar los valores que presentaban los animales adultos. El tratamiento con Captopril no tuvo efectos significativos sobre la contracción a FE en las SHR de 24 meses de edad, aunque si mejoró ligeramente la respuesta a ET-1 como en el caso de Losartán. Ninguno de los dos tratamientos modificó significativamente las respuestas constrictoras inducidas por el U46619 y la Ach+LNAME, en las SHR viejas. Sin embargo, la administración prolongada de Losartán y Captopril en las SHR adultas no tuvo efectos sobre la contracción inducida por la FE y la ET-1, ni tampoco sobre la respuesta al U46619. También, a diferencia de las SHR viejas, en las ratas adultas ambos tratamientos disminuyeron la contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach+LNAME.

Los distintos efectos que produce el tratamiento crónico con Losartán y Captopril entre las SHR de 6 y 24 meses de edad parecen deberse principalmente a las diferencias existentes en las respuestas vasoconstrictoras entre uno y otro grupo de animales. Como se ha discutido en el apartado 3.1.1 en las SHR viejas tanto la contracción dependiente de endotelio a la Ach+LNAME como la contracción a ET-1 están marcadamente atenuadas si se compara con las ratas adultas, por lo que esto podría explicar que el tratamiento en las ratas viejas no tuviera efectos sobre la contracción a Ach+LNAME o incluso mejorase la reducida respuesta a ET-1, como se ha demostrado que ocurre con el tratamiento antihipertensivo en situaciones donde también se observa una disminución de la respuesta a ET-1 (Dohi y cols., 1994). Sin embargo, las respuestas a AII y a FE están aumentadas con el envejecimiento y sólo el tratamiento con Losartán es capaz de reducirlas. En la disfunción vascular que presenta la SHR adulta no parecen estar implicadas anomalías de la respuesta adrenérgica ni de la respuesta a AII, o de la contracción inducida por la ET-1 y el U46619 en aorta, ya que estas respuestas son comparables a las de la WKY (Küing y Lüscher, 1995; Tesfamariam y Ogletree, 1995). Sin embargo, la contracción dependiente de endotelio a Ach en la SHR adulta está anormalmente incrementada respecto a la WKY y se ha sugerido que esta alteración podría ser consecuencia de una estimulada producción o liberación de EDCFs, principalmente  $\text{PGH}_2$  y/o  $\text{TXA}_2$ , que estaría participando en la disfunción endotelial

de este modelo de hipertensión (Küng y Lüscher, 1995; Lüscher y Vanhoutte, 1986; Auch-Schwelk y cols., 1992; Koga y cols., 1988). El tratamiento crónico con Losartán y Captopril es capaz de prevenir esta incrementada respuesta contráctil a la Ach+LNAME en la aorta de las SHR adultas. Este efecto también se ha comprobado en arterias mesentéricas de resistencia de las SHR adultas, donde el tratamiento con Losartán anulaba la contracción dependiente de endotelio a Ach (Li y cols., 1997a). Además, la reducción de la contracción a Ach inducida por estos tratamientos parece deberse principalmente a una disminución de los niveles de estos factores vasoconstrictores, más que a una reducción de su capacidad de respuesta, ya que la contracción inducida por la administración exógena del análogo del TXA<sub>2</sub>, U46619, que está mediada a través de los mismos receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, no se ve afectada por el tratamiento crónico con ninguno de los dos fármacos.

La disminución de los niveles de PA inducida por ambos tratamientos puede ser uno de los mecanismos por los que éstos reducirían la contracción dependiente de endotelio a la Ach+LNAME. El estrés hemodinámico de la pared arterial es un estímulo para la liberación de TXA<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>, por lo que una reducción del mismo podría conducir a una menor liberación de estos factores vasoconstrictores endoteliales. Las alteraciones estructurales del endotelio que tienen lugar en la hipertensión también podrían modificar su capacidad para sintetizar estos compuestos conduciendo a una estimulación de su producción, de esta forma las acciones del tratamiento sobre la estructura vascular también podrían estar contribuyendo en este efecto. Además, la AII es capaz de estimular la formación de un EDCF, presumiblemente TXA<sub>2</sub> en las células endoteliales (Manabe y cols., 1989) y también se ha descrito que la hipertensión inducida por la administración crónica de AII en ratas incrementa la contracción a Ach+LNAME en aorta (d'Uscio y cols., 1997). Por tanto, el tratamiento con fármacos que bloquean el SRA, bien como consecuencia de su acción interfiriendo con la AII, o de sus efectos sobre la PA y la estructura vascular, podrían reducir la liberación de TXA<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> y la contracción dependiente de endotelio a la Ach+LNAME en estos animales.

La mejora que produce el tratamiento crónico con Losartán sobre las respuesta a FE incrementada en las SHR viejas teóricamente también podría deberse a la actuación de varios mecanismos distintos. Entre ellos, a mecanismos no específicos como la disminución de la



PA y de las modificaciones estructurales, a un aumento en la disponibilidad de NO como sugiere el incremento de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos tras el tratamiento crónico con Losartán y que podría antagonizar el aumento en la respuesta vasoconstrictora, y a sus efectos directos relacionados con el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>. Sin embargo, teniendo en cuenta que el tratamiento crónico con Captopril también es capaz de reducir la PA y la hipertrofia vascular y que también está asociado con un aumento de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, la disminución en la contracción a FE producida por el tratamiento con Losartán parece deberse a efectos específicos derivados de su mecanismo de acción, que lo diferencian de Captopril. Además, este efecto también se produce con la adición de Losartán directamente al medio de incubación de los anillos aórticos, pero no con Captopril, como se discutirá más adelante, apoyando que las diferencias observadas entre los efectos de ambos tratamientos sobre la respuesta a FE serían consecuencia de los distintos mecanismos de acción de ambas drogas. El antagonismo de los receptores AT<sub>1</sub> que median la mayoría de las acciones características de la AII, no sólo daría lugar a la reducción de la respuesta constrictora de la AII, sino que también podría inhibir su acción facilitadora sobre la respuesta adrenérgica (Malik y Nasjletti, 1976; Dunn y cols., 1991) disminuyendo así la contracción a FE, como se ha demostrado que ocurre en el lecho mesentérico tanto de las SHR como de las WKY (Qiu y cols., 1994). Además, este incremento de la contracción a FE que presentan las SHR viejas podría ser secundario al incremento en la respuesta a AII que presentan estos animales, por lo que Losartán al reducir dicha respuesta, estaría disminuyendo también la contracción a FE. Captopril, a diferencia de Losartán que bloquea directamente las acciones de la AII, inhibe la formación de AII a través de la ECA. Se ha demostrado, sin embargo, que la ECA no es la única enzima capaz de sintetizar AII y que otras enzimas como la quimasa, responsable de la mayor parte de la producción local de la AII en el corazón humano (Husain, 1993), también podrían tener importancia en la formación vascular de AII y en sus acciones vasculares sobre la contracción adrenérgica (Malik y Nasjletti, 1976; Ziogas y Story, 1987), pudiendo explicar así los diferentes efectos de ambos tratamientos.

Hay que mencionar además que el tratamiento con Losartán tiene una mayor eficacia reduciendo la respuesta a AII en las SHR viejas que en las adultas y que esta diferencia en su efectividad para bloquear la respuesta a AII con la edad, podría explicar también en gran

medida el distinto efecto del tratamiento sobre la contracción inducida por la FE entre las ratas adultas y viejas. De esta forma, una mayor inhibición de la respuesta a AII en las ratas viejas podría reflejarse en un mayor efecto reduciendo la elevada contracción a FE. Así el tratamiento con Losartán sería más efectivo en una situación donde las respuestas a AII y FE están exacerbadas como ocurre en las SHR viejas, que en las adultas.

De todo lo expuesto se podría resumir que el tratamiento crónico con Losartán, a través del bloqueo de los receptores AT1, previene las alteraciones de la respuesta vasoconstrictora a AII y FE producidas por el envejecimiento en la SHR, y que tanto el tratamiento con Losartán como con Captopril atenúan la contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach en las SHR adultas.

### **3.2.2.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasoconstrictora**

Como ya se ha discutido previamente nuestros datos demuestran que el NO ejerce un papel modulador sobre la respuesta vasoconstrictora inducida por la FE y la ET-1, así como su excasa participación regulando la respuesta inducida por el U46619, tanto en las SHR adultas como en las viejas. El tratamiento crónico con Losartán o Captopril no parece tener efectos significativos sobre la acción moduladora del NO en la contracción, ya que la presencia del LNAME en el medio de incubación de los anillos aórticos incrementó la contracción a FE y a ET-1, pero no al U46619, en las SHR adultas y viejas, de forma similar en los animales con y sin tratamiento. La administración crónica de Losartán y Captopril produce un aumento de los niveles de nitratos y nitritos plasmáticos en las SHR de 6 y 24 meses de edad. Esto sugeriría que podría haber una mayor disponibilidad de NO durante el tratamiento, aunque ello no parece reflejarse en una mayor contribución de este factor endotelial atenuando la respuesta contráctil, ya que no hemos encontrado diferencias en la participación del NO en la respuesta vasoconstrictora tras el tratamiento de los animales. Este incremento en la disponibilidad de NO, sin embargo, si podría contribuir en el aumento de la respuesta vasodilatadora dependiente de NO producido por el tratamiento crónico con Losartán y Captopril, como se discutirá a continuación, sugiriendo que un incremento de la disponibilidad de NO podría tener más importancia en la relajación

dependiente de endotelio, que en la modulación de la respuesta constrictora.

### **3.2.3.- Efectos del tratamiento crónico con Losartán y Captopril sobre la respuesta vasodilatadora**

Existe un gran número de estudios que demuestran que el tratamiento con IECAs incrementa la vasorrelajación dependiente de endotelio en distintos tipos de hipertensión tanto en animales de experimentación como en humanos (Kähönen y cols., 1995; Schiffrin y Deng, 1995; Dohi y cols., 1994). De forma similar también el tratamiento con Losartán, y con otros antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub>, se ha relacionado con un aumento de la respuesta relajante dependiente de endotelio en la hipertensión (Dohi y cols., 1994; Li y cols., 1997a). De acuerdo con ello, el presente estudio confirma que la administración de Losartán o Captopril durante doce semanas estimula la relajación dependiente de endotelio a la Ach en anillos aórticos de SHR de 6 y 24 meses de edad. Además, ambos fármacos también normalizan la respuesta vasodilatadora a NPS en las ratas de 24 meses de edad, indicando que el tratamiento crónico con inhibidores del SRA previene el deterioro que se produce en la relajación dependiente e independiente de endotelio con el envejecimiento. De igual manera, Atkinson y cols. (1994a) observaron que el tratamiento crónico con un IECA también incrementaba el efecto máximo inducido por el carbacol, un agonista muscarínico, y por el NPS sobre la contracción a NA en lechos mesentéricos de ratas normotensas de 30 meses de edad.

La mejora en la respuesta vasodilatadora inducida por la administración continuada de Losartán y Captopril podría depender de varios mecanismos distintos a los que ya se ha hecho referencia con anterioridad. El principal factor mecánico responsable de la disfunción endotelial en la hipertensión es la PA elevada. La respuesta del endotelio vascular y de otras partes de la pared arterial a unas presiones elevadas mantenidas implica el desarrollo de modificaciones estructurales y funcionales que pueden afectar a la producción, liberación y acción de los distintos agentes endoteliales vasoactivos. Así, la reducción de los elevados niveles de PA producida por el tratamiento prolongado con Losartán y Captopril puede ser considerado como un mecanismo primario no específico que podría mejorar la función endotelial en las SHR adultas y viejas y normalizar la respuesta a NPS en las ratas viejas,

ya que ello supone una reducción en el estrés de la pared arterial. En este sentido, se ha demostrado que la administración crónica de Losartán o Captopril además de reducir los niveles de PA, estimula la relajación dependiente de endotelio en las SHR (Kähönen y cols., 1995; Dohi y cols., 1994; Li y cols., 1997a). Sin embargo, este efecto beneficioso de Losartán y Captopril no parece ser solamente secundario a su acción hipotensora, puesto que en la SHR el tratamiento crónico con hidralazina o amilodipino que también reduce la PA, no mejora la respuesta vasodilatadora a la Ach (Bennett y cols., 1996; Clozel y cols., 1990).

Otro mecanismo no específico podría estar relacionado con los efectos de ambos tratamientos sobre la estructura vascular y en concreto sobre la hipertrofia aórtica que presenta la SHR y que podría estar implicada en el deterioro de la función endotelial y muscular observada. Una reducción de estas alteraciones estructurales, por lo tanto, podría participar en la mejora de la funcionalidad arterial incrementando la relajación a la Ach en las SHR adultas y normalizando la respuesta a Ach y a NPS en las ratas viejas.

El tratamiento crónico con ambos fármacos además, no sólo tiene efectos beneficiosos sobre la PA o la hipertrofia vascular, sino que como también se ha mencionado se asocia con un aumento de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos en las SHR adultas y viejas. Esto sugeriría que tanto Losartán como Captopril administrado de forma crónica podrían incrementar la producción o la disponibilidad de NO y contribuir así a incrementar la relajación dependiente de endotelio a Ach en estos animales. Los antagonistas del receptor  $AT_1$  y los IECAs, en adición a sus efectos sobre la AII, pueden afectar a otros sistemas vasoactivos. Los IECAs aumentan la disponibilidad de kininas (Carretero y cols., 1981) y pueden estimular también la síntesis de NO, PGs y EDHF en preparaciones vasculares (Bennett y cols., 1996; Gohlke y cols., 1993; Kähönen y cols., 1995; Mombouli y cols., 1992; Wiemer y cols., 1991). Similarmente, los antagonistas de los receptores  $AT_1$  también pueden estimular la producción de NO y PGs (Jaiswal y cols., 1991; Goehlke y cols., 1996) aumentando los niveles de NO y de otros factores vasodilatadores que mejorarían la disfunción endotelial.

Además, Losartán y Captopril también podrían aumentar la disponibilidad de NO disminuyendo su degradación. Se ha descrito que la AII podría aumentar la producción

vascular de aniones superóxido a través de la activación de la NADH/NADPH oxidasa de la membrana (Griendling y cols., 1994) y que esto se asocia con una disminución de la relajación a Ach (Rajagopalan y cols., 1996). Dicho efecto parece ser dependiente de los receptores AT<sub>1</sub>, ya que Losartán normalizaba la producción de aniones superóxido y la disfunción endotelial (Rajagopalan y cols., 1996). Estas evidencias sugieren que el tratamiento con fármacos que inhiben la AII puede disminuir la producción de radicales libres, evitando la degradación del NO, lo que también podría incrementar la relajación dependiente de endotelio.

Numerosos trabajos demuestran que una estimulada liberación de EDCFs como el TXA<sub>2</sub> o la PGH<sub>2</sub> puede ser responsable de la disminución de la relajación a Ach en los vasos aislados de SHR adultas, ya que estos factores pueden antagonizar la acción vasodilatadora del NO (Küng y Lüscher, 1995; Lüscher y Vanhoutte, 1986; Tesfamariam y Ogletree, 1995; Kato y cols., 1990; De Mey y Gray, 1985; Tesfamariam y Halpern, 1988; Diederich y cols., 1990). Además, durante la formación de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> a partir del ácido araquidónico también se producen aniones superóxido (Moncada y Vane, 1978) que podrían inactivar el NO y contribuir así también a la disminución de la relajación inducida por la Ach. Tanto el tratamiento crónico con Losartán como con Captopril reducen la contracción dependiente de endotelio a Ach en las SHR adultas, por lo que éste podría ser un mecanismo importante para mejorar la relajación a Ach en estos animales.

También una disminución de la respuesta vasoconstrictora independiente de endotelio podría aumentar la respuesta vasodilatadora a la Ach y al NPS. Este mecanismo podría ser relevante sobre todo en las SHR viejas, ya que el envejecimiento está asociado con un incremento de las respuestas a AII y FE. Un aumento de la contracción a AII como presentan las SHR viejas podría ser responsable, al menos en parte, de la disminución de la relajación dependiente e independiente de endotelio, ya que se ha demostrado que la AII podría estar implicada en la reducción de la respuesta relajante a Ach y a NPS (d'Uscio y cols., 1997). Por tanto, la inhibición de la formación de la AII o de sus acciones, que produce el tratamiento con Captopril o Losartán respectivamente, podría contribuir de forma directa al incremento de estas respuestas.

### **3.3.- CONSECUENCIAS DE LA PRESENCIA DE LOSARTAN Y CAPTOPRIL EN EL MEDIO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN LAS SHR ADULTAS Y VIEJAS**

#### **3.3.1.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasoconstrictora**

La acción vasoconstrictora inducida por la AII no sólo se produce a través de su efecto directo sobre el músculo liso vascular, sino también a través de su capacidad para modular la función simpática neural por múltiples mecanismos, incluyendo un incremento en la biosíntesis de catecolaminas, una estimulación de las células ganglionares y de la liberación de catecolaminas de la médula adrenal y una atenuación de la recaptura presináptica (Hano y cols., 1994; Khairallah, 1972; Roth, 1972). Asimismo, la AII tiene importantes interacciones con otros agentes vasoactivos que también pueden mediar su efecto vasoconstrictor. Se ha demostrado que la AII puede incrementar la producción de ET en células endoteliales y mesangiales cultivadas de rata (Chua y cols., 1993; Kohno y cols., 1992), lecho vascular (Dohi y cols., 1992), riñón (Abassi y cols., 1993) y corazón (Brunner y Kukovetz, 1996) y por tanto podría participar en la acción vasoconstrictora de la AII. Además, esta producción parece estar aumentada por la hipertensión (Ikeda y cols., 1995). Se ha comprobado también que la ET-1 puede mediar algunos de los efectos hipertróficos cardíacos de la AII (Ito y cols., 1993; Ishiye y cols., 1995) y que está implicada en la hipertensión inducida por la AII (d'Uscio y cols., 1997). Una situación similar se ha descrito para el TXA<sub>2</sub>, ya que la AII estimula la síntesis de TXA<sub>2</sub> (Wilcox y Welch, 1990), y por tanto podría mediar también el efecto presor de la AII. De hecho este vasoconstrictor derivado del endotelio contribuye en la respuesta constrictora de la AII en anillos aórticos de ratas con hipertensión por coartación aórtica (Lin y Nasjletti, 1991), en arterias mesentéricas de SHR (Lang y cols., 1995) y en arteria cerebral de perro (Manabe y cols., 1989). Además, el TXA<sub>2</sub> también parece estar implicado en el origen y/o mantenimiento de la hipertensión dependiente de AII (Mistry y Nasjletti, 1990; Lin y cols., 1991; Lin y Nasjletti, 1991).

Por otro lado, la relación entre la AII y los otros factores vasoconstrictores mencionados también parece tener lugar en sentido inverso, de forma que la AII a su vez podría participar o contribuir en las acciones de éstos. Confirmando este concepto, el presente estudio demuestra que la preincubación de los anillos aórticos de las SHR de 6 meses de edad con el antagonista del receptor  $AT_1$  de AII, Losartán, reduce la contracción inducida por la FE, la ET-1, el análogo del  $TXA_2$ , el U46619, y la Ach+LNAME. En las SHR de 24 meses de edad Losartán también es capaz de reducir la respuesta a la FE y al U46619. Así, las catecolaminas no sólo pueden participar en el efecto vasoconstrictor inducido por la AII, sino que también la AII potencia la respuesta adrenérgica. Esta acción facilitadora de la AII se ha descrito en vasos aislados de animales normotensos, donde la administración de dosis no presoras de AII incrementa la contracción del músculo liso vascular tanto a la estimulación de los nervios simpáticos como a la activación adrenérgica (Malik y Nasjletti, 1976; Dunn y cols., 1991). De manera semejante, el antagonista de los receptores  $AT_1$ , Losartán, reduce la respuesta contáctil inducida por la FE en anillos aórticos de SHR de 6 y 24 meses de edad, sugiriendo que la AII endógena a través de los receptores  $AT_1$  juega un papel mediador en la contracción inducida por este agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico en la SHR. Un resultado similar obtuvieron Qiu y cols. (1994) en arterias mesentéricas de SHR y WKY, donde Losartán atenuaba la disminución del diámetro y del flujo producido por la FE. Este efecto de Losartán sobre la respuesta a FE en la SHR parece ser independientemente de la edad, puesto que se sigue manteniendo en las ratas viejas de 24 meses. Es importante mencionar también que la acción de Losartán reduciendo el tono vasoconstrictor inducido por la FE no parece deberse a un antagonismo parcial de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, ya que se ha comprobado que Losartán no presenta actividad antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgica (Chiu y cols., 1991).

Algo similar ocurre con la relación entre la AII y la ET-1. La AII promueve la liberación de ET-1 que puede actuar como un amplificador de los efectos presores del SRA, pero también se ha demostrado que la ET es capaz de estimular la secreción de renina en arterias mesentéricas de rata (Rakugi y cols., 1990) y aumenta la actividad de la ECA en células endoteliales (Kawaguchi y cols., 1991) y musculares lisas (Moroi y cols., 1996), lo que indicaría que la ET podría inducir la síntesis de AII en la pared vascular. Además, la AII potencia las contracciones inducidas por la ET-1 en bronquios (Nally y cols., 1994). En

el presente estudio se observa este tipo de interacción entre la ET-1 y la AII, puesto que el antagonista de los receptores AT<sub>1</sub>, Losartán, atenúa la contracción inducida por la ET-1 en anillos aórticos de las SHR adultas, sugiriendo que la AII endógena a través de estos receptores podría mediar la respuesta de este factor vasoconstrictor derivado del endotelio. Corroborando esto, también se ha demostrado que el antagonista de los receptores AT<sub>1</sub>, LR-B/081, disminuye la vasoconstricción inducida por la ET-1 en riñón perfundido aislado de ratas jóvenes (Cirillo y cols., 1995). Por tanto, estos resultados muestran una situación muy semejante a la que ha sido previamente descrita para la FE. Sin embargo en las SHR viejas, a diferencia de lo que ocurre en el caso del agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, la presencia de Losartán no tiene efectos significativos sobre la contracción a ET-1. Esta aparente carencia de efecto podría explicarse por la distinta respuesta contráctil que presenta la ET-1 con el envejecimiento, ya que mientras en las ratas adultas su respuesta es muy potente y prolongada en el tiempo, en las ratas viejas la respuesta desarrollada a ET-1 está muy atenuada. Por tanto, el efecto de la preincubación con Losartán sobre la contracción a ET-1 en las SHR viejas no parece importante en esta situación donde su respuesta está ya drásticamente disminuida.

Numerosos trabajos de investigación han demostrado también la importante interrelación entre el TXA<sub>2</sub> y el SRA. En nuestro estudio la AII también parece estar implicada en la respuesta del TXA<sub>2</sub>, ya que la preincubación de los anillos aórticos con Losartán, produce un desplazamiento hacia la derecha de la curva de concentración-respuesta al análogo del TXA<sub>2</sub>, el U46619, tanto en las SHR de 6 meses, como en las de 24 meses de edad, sugiriendo que la AII podría participar en la respuesta contráctil no sólo de la FE y de la ET-1, sino también del TXA<sub>2</sub>, y que esta acción parece ser independiente de la edad de los animales. Sin embargo, a diferencia de la FE y la ET-1, Losartán disminuye los valores de pD<sub>2</sub> para el U46619, lo que sugiere que estaría reduciendo la sensibilidad a este agonista. Este mismo efecto de Losartán disminuyendo la sensibilidad al U46619 se ha observado en arterias coronarias de perro (Li y cols., 1997b). Aunque no hay una explicación clara para el diferente efecto de Losartán sobre la sensibilidad a estos tres agentes vasoconstrictores, teniendo en cuenta que la respuesta constrictora del TXA<sub>2</sub> y de su análogo son mediados por su interacción con receptores TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, la reducción en los valores de pD<sub>2</sub> para el U46619, podría ser explicada en parte, por una acción antagonista



de Losartán sobre dichos receptores. Apoyando esta hipótesis se ha demostrado que Losartán es un débil antagonista competitivo de los receptores de  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$  de plaquetas humanas, aunque su afinidad por éstos es 1000 veces menor que por los receptores  $\text{AT}_1$  (Liu y cols., 1992). También Corriu y cols. (1995) y Bertolino y cols. (1994) han sugerido que Losartán podría interferir con los receptores vasculares de  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$  en ratas normotensas. De esta forma, el efecto de Losartán reduciendo la sensibilidad al U46619 podría ser atribuido en cierta medida a su débil efecto antagónico sobre estos receptores de  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ .

La presencia de Losartán en el medio también disminuye la contracción dependiente de endotelio a la Ach+LNAME en las SHR adultas. Considerando que la contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach está mediada principalmente por el  $\text{TXA}_2$  y/o la  $\text{PGH}_2$ , el mecanismo por el cual Losartán reduce la contracción a la Ach+LNAME sería similar al descrito anteriormente para el análogo del  $\text{TXA}_2$ . Esto sugeriría que la AII podría mediar también la respuesta constrictora dependiente de endotelio en la SHR adulta. En las SHR viejas la presencia de Losartán no tiene un efecto significativo sobre la contracción inducida por la Ach+LNAME. Esto parece ser consecuencia, como en el caso de la respuesta a ET-1, a que el envejecimiento produce una disminución de la contracción dependiente de endotelio a la Ach en la SHR, por lo que Losartán no afectaría de forma relevante a esta respuesta que ya se encuentra marcadamente atenuada en las ratas viejas.

Hay que mencionar además que la reducción de la contracción a la Ach+LNAME en las SHR adultas no sólo se produce con la adición de Losartán al medio de incubación, sino también tras el tratamiento crónico de los animales con Losartán y Captopril. Sin embargo, la disminución de la contracción a Ach inducida por los tratamientos parece deberse más a una reducción de los niveles de  $\text{TXA}_2$  y/o  $\text{PGH}_2$  que a un efecto sobre su respuesta como se ha comentado en el apartado 3.2.1, mientras que el efecto de la preincubación con Losartán sería consecuencia principalmente de una disminución de su capacidad de respuesta, puesto que la presencia de Losartán en las mismas condiciones también reduce la respuesta inducida por el U46619. Esto parece indicar la posibilidad de que estén actuando distintos mecanismos mediando los efectos producidos por la presencia del fármaco en el medio, de los producidos por el tratamiento crónico de los animales, donde podrían estar participando tanto sus acciones hemodinámicas como sobre la estructura

vascular.

Asimismo, el hecho de que el tratamiento crónico de las SHR adultas con Losartán, al contrario de lo que ocurre con la presencia de Losartán en el medio de incubación, carezca de efectos sobre la contracción a la FE, la ET-1 y el U46619 también parece sugerir la existencia de distintos mecanismos implicados en la acción directa de Losartán cuando está presente en el medio y en sus efectos tras el tratamiento continuado de los animales. La principal diferencia entre los efectos directos del fármaco y los efectos inducidos por el tratamiento crónico radica en la respuesta a AII. La adición de Losartán al medio de incubación de los anillos aórticos bloquea la respuesta inducida por la AII, que sería la responsable de la potenciación de la contracción a la FE, la ET-1 y a los agonistas del receptor de  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$  en las SHR adultas. Sin embargo, la respuesta inducida por la AII en los anillos aórticos de las ratas adultas tratados crónicamente con Losartán sólo está ligeramente reducida, por lo que ésta podría seguir manteniendo su acción facilitadora en la vasoconstricción a estos agentes. Esto no ocurre así en las SHR de 24 meses de edad, donde tanto la presencia de Losartán en el medio como el tratamiento crónico de los animales produce un efecto similar, ya que la administración prolongada de Losartán, aunque no anula totalmente la contracción a AII, si disminuye marcadamente su respuesta, evitando de esta forma su acción facilitadora adrenérgica y reduciendo la contracción a FE igual que se observa con la presencia del fármaco en el medio.

Resumiendo podemos decir que los efectos directos de Losartán sobre la acción vasoconstrictora de la FE, la ET-1, el U46619, así como sobre la contracción dependiente de endotelio a la Ach+LNAME estarían relacionados con el bloqueo de los receptores  $\text{AT}_1$  y de la respuesta a AII. Sin embargo, también se podría pensar que podría tratarse de un efecto general del fármaco sobre los mecanismos implicados en la contracción del músculo liso vascular, pero este efecto parece ser específico de la vasoconstricción mediada por receptor inducida por estos agentes, ya que la respuesta contráctil inducida por KCl no se vió modificada en presencia de Losartán, al igual que ocurría con el tratamiento crónico de los animales. Además se ha demostrado que Losartán carece de efectos sobre los niveles intracelulares de inositol trifosfato y de calcio (Israel y cols., 1995; Poggioli y cols., 1992; Ko y cols., 1992; Burnier y cols., 1991) y que sólo inhibe el incremento en el sistema de

señales de los fosfoinositoles y la elevación del calcio intracelular inducido por la AII, y no por otros vasoconstrictores (Ko y cols., 1992). El efecto de Losartan reduciendo la contracción a estos agentes tampoco parece deberse a una posible acción vasodilatadora del fármaco, puesto que la presencia de Losartán no es capaz de producir la relajación de los anillos aórticos precontraídos con FE, ni de modificar su tensión basal.

Los resultados de este estudio también demuestran que la preincubación de los anillos aórticos con Captopril no parece tener ningún efecto significativo sobre la respuesta constrictora inducida por la FE, la ET-1, el U46619, y la Ach+LNAME en las SHR de 6 o 24 meses de edad. Asimismo, como ocurría con el tratamiento crónico de los animales con Captopril y como se ha publicado en estudios previos (Antonaccio y cols., 1981), la contracción a KCl tampoco se ve modificada con la presencia del fármaco en el medio de incubación. Aunque existen numerosos estudios donde los IECAs reducen la contracción  $\alpha$ -adrenérgica en ratas normotensas, en la SHR sólo en algunos trabajos *in vivo* pero no *ex vivo* se observa este efecto (Antonaccio y cols., 1981; Atkinson y cols., 1987). Así, confirmando nuestros resultados, estos autores encontraron que Captopril no alteraba la vasoconstricción mediada por el simpático en la arteria caudal, ni disminuía la respuesta a NA en aorta de SHR. También Nishimura y cols. (1995) observaron que la respuesta constrictora inducida por la NA en el lecho mesentérico de SHR estaba reducida por Losartán pero no por Captopril. Algunos autores también demuestran que Captopril no modifica el efecto vasoconstrictor agudo de la ET-1 en diferentes lechos vasculares de animales normotensos (Anderson y cols., 1995; Bauer y cols., 1995). De igual forma, existen estudios donde la adición de Captopril tampoco afecta a la contracción mediada por los receptores de  $TXA_2/PGH_2$  en anillos aórticos de SHR (Dyer y cols., 1994).

Esta ausencia de efecto de Captopril, al contrario de lo que ocurre con Losartán, sobre la respuesta vasoconstrictora mediada por receptor en anillos aórticos de SHR, parece ser una consecuencia de su diferente mecanismo de acción como ya se ha discutido en el apartado 3.2.1. De este modo, las diferencias entre el antagonista de los receptores AT1 y el inhibidor de la ECA podrían ser debidas a que la AII implicada en la potenciación de la vasoconstricción inducida por estos agonistas podría ser formada localmente a través de una vía enzimática diferente de la ECA. Se sabe que además del eje enzimático clásico renina-

ECA, pueden existir múltiples vías de formación de la AII en la pared vascular, tales como la quimasa, que puede participar en la formación de la AII a través de diferentes vías (Dzau y cols., 1993). Apoyando esta teoría, se ha observado que la AII generada a través de una vía no-renina, no ECA potencia la contracción simpática en vasos aislados de animales normotensos, ya que la administración tanto de inhibidores de renina como de IECAs no altera la acción facilitadora de la vasoconstricción neurogénica inducida tanto por AI como por sustratos de la renina (Malik y Nasjletti, 1976; Ziogas y Story, 1987). De igual forma es posible proponer que la AII que participa en la vasoconstricción inducida por la ET-1 y el TXA<sub>2</sub>, en anillos aórticos de SHR puede ser formada localmente a través de una vía enzimática no dependiente de la ECA. Por tanto, la diferencia en la eficacia de ambos fármacos, reduciendo la respuesta vasoconstrictora podría depender de la existencia de otras enzimas, no sensibles al bloqueo de los IECAs, capaces de formar AII y que podrían estar implicadas en la potenciación de la vasoconstricción a estos agentes.

Considerando todos estos resultados parece que la AII a través de su unión a los receptores AT<sub>1</sub> ejercería una acción central en el control de la respuesta vasoconstrictora en la aorta de SHR, potenciando la contracción inducida por la FE, la ET-1 y el TXA<sub>2</sub>. Además, se podría proponer que sería la AII vascular no dependiente de la ECA la que desempeñaría este papel facilitador en el mecanismo de vasoconstricción inducida por dichos factores y que ello podría tener una gran importancia en la regulación del tono vascular, así como en la hipertensión que desarrollan estos animales.

### **3.3.2.- Efecto de la inhibición del NO en las acciones inducidas por la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasoconstrictora**

Teniendo en cuenta el papel que ejerce el NO modulando la contracción vascular y que este factor endotelial actúa como antagonista fisiológico de las acciones de la AII a nivel vascular y renal (Gruetter y cols., 1988; Ito y cols., 1991; DeNicola y cols., 1992), se podría pensar que el NO podría estar participando en los efectos vasculares del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> de AII sobre la respuesta contristora. El presente trabajo demuestra este hecho, puesto que el efecto de Losartán sobre la respuesta vasoconstrictora en la SHR desaparece total o parcialmente en presencia del inhibidor de la síntesis de NO. Así, la

preincubación de los anillos aórticos con LNAME revierte el efecto de Losartán atenuando la contracción máxima inducida por la FE en el caso de las SHR viejas y de la FE y la ET-1 en las ratas adultas, sugiriendo que el NO estaría implicado en dicho efecto. En este mismo sentido, también se ha demostrado que el NO media el efecto antihipertensivo de Losartán en SHR (Chachofeiro y cols., 1995). Además el NO participa en los efectos sobre la hemodinámica renal inducidos por la administración aguda de Losartán en SHR anestesiadas (Muñoz-García y cols., 1995).

El NO también parece estar mediando en parte el efecto de Losartán reduciendo la contracción al U46619 en anillos aórticos de SHR adultas y viejas, ya que la presencia de LNAME en el medio de incubación revierte parcialmente el efecto de Losartán. El hecho de que el LNAME revierta sólo parcialmente el efecto de Losartán sobre la respuesta inducida por el U46619 y no totalmente como en el caso de la FE y la ET-1, sugiere la existencia de otro u otros mecanismos distintos, que no dependen de NO, implicados en la acción de Losartán sobre la contracción al análogo del TXA<sub>2</sub>. Este mecanismo no mediado por NO, podría estar relacionado con el efecto antagónico que presenta Losartán sobre los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, al que ya se ha hecho referencia en el apartado anterior.

En el caso de la contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach+LNAME, Losartán fue capaz de atenuar esta respuesta a pesar de estar presente el inhibidor de la síntesis de NO en el medio de incubación, lo que cuestionaría el papel del NO en los efectos vasculares inducidos por Losartán. Sin embargo, esta aparente contradicción con lo observado con los otros agonistas se podría explicar si se piensa que el efecto de Losartán reduciendo la contracción al análogo del TXA<sub>2</sub> sólo es parcialmente revertido en presencia de LNAME, manteniéndose parte de su efecto en ausencia de NO e implicando a un mecanismo distinto en su acción. Algo similar podría estar ocurriendo con la respuesta constrictora inducida por la Ach, ya que también parece estar mediada por el TXA<sub>2</sub> y/o la PGH<sub>2</sub>, de forma que el efecto de Losartán observado correspondiera sólo al que no depende NO y no al efecto total que potencialmente podría inducir el fármaco si no estuviera presente el inhibidor de la síntesis de NO en el medio de incubación. La reducción que produce Losartán sobre la contracción a Ach por tanto, podría estar relacionada como en el caso del U46619 con el efecto antagónico que presenta Losartán sobre los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>.

El mecanismo por el cual el NO puede participar en la atenuación de la respuesta vasoconstrictora mediada por receptor inducida por Losartán no se conoce demasiado bien, sin embargo se podría sugerir que Losartán podría estimular la síntesis de NO, el cual antagonizaría la vasoconstricción inducida por estos agentes. Aunque en nuestro estudio no tenemos evidencias de que este antagonista de los receptores  $AT_1$ , pueda estimular la síntesis de NO en condiciones agudas, si hemos observado que Losartán administrado crónicamente estaba asociado con un incremento de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos. Similarmente se ha descrito que el tratamiento crónico de SHR *stroke-prone* con Losartán incrementa el contenido aórtico de GMPc (Goelke y cols., 1996). En presencia del antagonista específico de los receptores  $AT_1$ , la AII generada localmente podría unirse a los receptores  $AT_2$  libres y estimular así la síntesis de NO (Wiemer y cols., 1993; Seyedi y cols., 1995) que mediaría sus efectos. De acuerdo con esto, nosotros hemos demostrado que el efecto de Losartán disminuyendo la contracción a FE en la SHR no sólo se revierte en presencia de LNAME, sino también en presencia de un antagonista de los receptores  $AT_2$  de AII (Maeso y cols., 1996). Apoyando esta hipótesis además se ha observado que los efectos inducidos por la administración aguda de Losartán sobre la función excretora en SHR anestesiadas dependen de las acciones de la AII a través de los receptores  $AT_2$  (Muñoz-García y cols., 1995).

Por último habría que mencionar que la presencia de LNAME no afecta a las acciones de Captopril en el medio de incubación sobre la vasoconstricción, al no tener este fármaco efectos significativos sobre la respuesta vasoconstrictora en la SHR, por lo que la inhibición de la síntesis de NO sólo va a producir un incremento de la respuesta vasoconstrictora igual que ocurre en los anillos aórticos no preincubados con Captopril.

En resumen, todos estos datos indican que la acción de Losartán sobre la respuesta vasoconstrictora depende en mayor o menor medida del NO, ya que su presencia parece ser necesaria para la plena expresión de los efectos del antagonista de los receptores  $AT_1$  de AII sobre la contracción inducida por estos agentes en la aorta de la SHR.

### 3.3.3.- Efectos de la presencia de Losartán y Captopril en el medio sobre la respuesta vasodilatadora

Tanto la presencia de Losartán como de Captopril en el medio de incubación de los anillos aórticos mejoró la relajación dependiente e independiente de endotelio inducida por la Ach y el NPS respectivamente en las SHR de 24 meses de edad, aunque estos efectos no fueron tan marcados como los observados con el tratamiento crónico de los animales. La preincubación de los anillos aórticos de las ratas adultas con Losartán y Captopril, sin embargo, no tuvo efectos sobre la respuesta vasodilatadora a pesar de que el tratamiento crónico con ambos fármacos si incrementó la relajación dependiente de endotelio en estos animales.

El mecanismo por el cual la presencia de estos fármacos en el medio incrementa la respuesta relajante sólo en las SHR viejas no está del todo claro, pero estos efectos directos de Losartán y Captopril no son consecuencia de un efecto vasodilatador de los fármacos, ya que ninguno de ellos fue capaz de disminuir el tono vascular basal o el de los anillos precontraídos con FE, ni tampoco de efectos hemodinámicos. Aunque en un principio la mejora de la disfunción endotelial producida por el tratamiento antihipertensivo con Losartán y con IECAs, se ha atribuido a su acción disminuyendo las cifras de PA, sin embargo, como ya se ha mencionado en varias ocasiones a lo largo de esta discusión, éste no parece ser el único mecanismo implicado en el efecto de los fármacos que inhiben el SRA. Nuestros resultados confirman este hecho, puesto que la reducción de la PA no es el mecanismo principal por el que dichos fármacos potencian la relajación dependiente e independiente de endotelio en las SHR viejas, ya que también, aunque en menor grado, en ausencia de su acción antihipertensiva Losartán y Captopril son capaces de mejorar la respuesta vasodilatadora. Por tanto, este aumento de la vasorrelajación dependiente e independiente de endotelio inducida por la preincubación de los anillos aórticos de las ratas viejas con Losartán y Captopril parece deberse a mecanismos específicos de estas drogas, que también serían independientes de sus efectos sobre la estructura de la pared arterial. En las SHR adultas, a diferencia de las viejas, el incremento en la relajación dependiente de endotelio inducido por el tratamiento con Losartán y Captopril si parece depender en gran medida de sus acciones sobre la PA y/o sobre la estructura vascular, ya que la adición de los fármacos

al medio de incubación de los anillos aórticos carece de efectos en estos animales.

Varios mecanismos específicos de estos fármacos que interfieren con el SRA podrían ser responsables para la mejora de la relajación dependiente e independiente de endotelio en las SHR viejas, algunos de los cuales ya han sido citados en los efectos crónicos del tratamiento. Las SHR viejas presentan una mayor respuesta a AII en aorta que las adultas y también la actividad ECA parece estar incrementada con la edad en la SHR (Lang y cols., 1995). Estos datos parecen indicar que habría una estimulación de la actividad del SRA durante el envejecimiento, lo que podría estar implicado en la disminución de la respuesta vasodilatadora a través del aumento de las acciones de la AII. Así, un aumento de la respuesta a AII no sólo podría antagonizar la relajación dependiente e independiente de endotelio, sino que también podría estimular la producción vascular de aniones superóxido disminuyendo la disponibilidad de NO (Griendling y cols. 1994; Rajopalan y cols., 1996). Por tanto, la inhibición de la formación de AII, o el bloqueo de sus acciones con la adición de Captopril o Losartán respectivamente al medio de incubación parece ser el mecanismo principal implicado en la estimulación de la respuesta vasodilatadora en la aorta de estos animales. Asimismo, una mayor actividad del SRA en las SHR viejas podría explicar también porque la preincubación con fármacos que inhiben el SRA no tiene los mismos efectos sobre la respuesta vasodilatadora en las ratas adultas y en las viejas. De acuerdo con ello, la preincubación con Losartán o Captopril tendría mayores consecuencias en una situación donde existe una respuesta exagerada a la AII y una elevada actividad ECA, como en las SHR viejas que en las adultas.

Estos fármacos además de inhibir la AII, pueden estimular la síntesis o la disponibilidad de sistemas vasodilatadores como las kininas, la PGI<sub>2</sub>, el EDHF y el NO en el caso de los IECAs (Carretero y cols., 1981; Wiemer y cols., 1991; Bennett y cols., 1996; Gohlke y cols., 1993, Kähönen y cols., 1995; Mombouli y cols., 1992) y de PGI<sub>2</sub> y NO en el caso de Losartán (Jaiswal y cols., 1991; Gohlke y cols., 1996). Por tanto, Losartán y Captopril también podrían mejorar la relajación en las SHR viejas estimulando estos factores.



Considerando todo lo expuesto parece que las acciones directas de Losartán y Captopril podrían tener una especial relevancia en los efectos beneficiosos del tratamiento sobre la respuesta vasodilatadora en las SHR viejas, aunque también contribuyan a ello sus efectos sobre la PA y la estructura vascular; mientras que en las ratas adultas la estimulación de la relajación dependiente de endotelio se debe en gran parte al efecto antihipertensivo y/o antihipertrófico de estos fármacos. Por último habría que destacar que tanto en las SHR adultas como en las viejas un aumento en la disponibilidad de NO podría participar de forma importante en la mejora de la respuesta vasodilatadora que producen dichos fármacos.

*CONCLUSIONES*

---

1.- La AII, actuando a través de los receptores AT<sub>1</sub>, es responsable en gran medida de las alteraciones de la función vascular que produce el envejecimiento en la SHR.

2.- La AII vascular producida por una vía distinta de la ECA facilita la vasoconstricción inducida por la fenilefrina, la endotelina-1 y los agonistas del receptor de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> en la SHR, ya que Losartán, pero no Captopril, inhibe dicha acción. Este efecto inducido por Losartán parece estar mediado por el NO.

3.- En las SHR viejas Losartán y Captopril mejoran la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente de endotelio, y estos efectos parecen depender principalmente de la inhibición de la AII y en menor medida de sus acciones sobre la PA y la estructura vascular.

4.- En las SHR adultas el efecto antihipertensivo y/o antihipertrófico del tratamiento con Losartán y Captopril parece ser el principal mecanismo implicado en la mejora de la disfunción endotelial.

5.- Tanto en las SHR viejas como en las adultas un aumento en la disponibilidad de NO podría participar también en el efecto antihipertensivo, antihipertrófico y en la mejora de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio que producen Losartán y Captopril.

***BIBLIOGRAFIA***

---

Abassi ZA, Klein H, Golomb E, Keiser HR. Regulation of the urinary excretion of endothelin in the rat. *Am J Hypertens* 1993; 6:453-457.

Abbas A, Gorelik G, Garbini LA, Scicli AG. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 1997; 30:217-221.

Abrams WB. Pathophysiology of hypertension in older patients. *Am J Med* 1988; 85(suppl 3B):7-13.

Akopov SE, Orekhov AN, Tertov VV, Khashimov KA, Gabrielyan ES, Smirnov VN. Stable analogues of prostacyclin and tromboxane A2 display contradictory influences on atherosclerotic properties of cells cultured from human aorta: The effect of calcium antagonists. *Atherosclerosis* 1988; 72:245-248.

Altieri RJ, Kiritsy-Roy JA, Catravas JD. Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: Role of tromboxane A2. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 236:535-541.

Amerini S, Mantelli L, Filippi S. Effects of aging and hypertension on vasorelaxant activity of calcitonin gene-related peptide: a comparison with other vasodilator agents. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:432-437.

Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 663:85-96.

Anderson GH Jr, Streeten DHP, Dalakas TG. Pressor responses to 1-Sar-8-Ala-angiotensin II (saralasin) in hypertensive subjects. *Circ Res* 1977; 40:243-250.

Anderson WP, Heguilen RM, Woods RL. Intrarenal infusions of endothelin in conscious dogs: Interactions with prostanoids and angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:511-517.

Antonaccio MJ, Rubin B, Kotler D. Effects of captopril on vascular reactivity of SHR in vivo and in vitro. *Hypertension* 1981; 3(2):II-211-215.

Applegate WB. Hypertension in elderly patients. *Ann Intern Med* 1989; 110(11):901-915.

Arribas S, Marín J, Ponte A. Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta-adrenoreceptors. Impairment by ageing and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:520-527.

Asaad MM, Antonaccio MJ. Vascular wall renin in spontaneously hypertensive rats: potential relevance to hypertension maintenance and antihypertensive effect of captopril. *Hypertension* 1982; 4:487-493.

Atkinson J, Tatchum-Talom R, Corman B. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. III. Endothelial function of mesenteric arterial bed of rat. *Am J Physiol* 1994a; 267:R136-R143.

Atkinson J, Sonnay M, Sautel M, Fouda AK. Chronic treatment of spontaneously hypertensive rat with captopril attenuates responses to noradrenaline in vivo but no in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1987; 335:624-628.

Atkinson J, Tatchum-Talom R, Capdeville-Atkinson C. Reduction of endothelial function with age in the mesenteric arterial bed of the normotensive rat. *Br J Pharmacol* 1994b; 111:1184-1188.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 1992; 19:442-445.

Auch-Schwelk W, Vanhoutte PM. Endothelium-derived contracting factor released by serotonin in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 1991; 4:769-772.

Azizi M, Levy B, Salzmann JL, Cerol ML, Poitevin P, Ménard J, Michel JB. Long-term cardiac effects of hypotensive agents in normotensive mature rats: comparison of beta-blocking agent and converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13:691-701.

Azuma H, Hamasaki H, Nimi Y, Terada T, Matsubara O. Role of endothelin-1 in neointima formation after endothelial removal in rabbit carotid arteries. *Am J Physiol* 1994; 267(36):H2259-H2267.

Bacon CR, Cary NRB, Davenport A. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res* 1996; 79:794-801.

Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 1979; 237:F333-F343.

Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Lüscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 1997; 30:817-824.

Bauer B, Neubauer S, Spinler M, Dürr R, Becker HH, Ertl G. Interference of angiotensin-converting enzyme inhibition with vasoactive peptides in the coronary circulation of dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25:756-762.

Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 1989; 13:968-972.

Belmin J, Corman B, Merval R, Tedgui A. Age-related changes in endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. *Am J Physiol* 1993; 264:H679-H685.

Bell L, Madri JA. Effect of platelet factors on migration of cultured bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 1989; 65:1057-1065.

Benetos A, Poitevin P, Prost PL, Safar ME, Levy BI. Life survival and cardiovascular structures following selective beta-blockade in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1994; 7(2):186-192.

- Bennett MA, Hillier C, Thurston H. Endothelium-dependent relaxation in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats: effect of long-term treatment with perindopril, quinapril, hydralazine or amlodipine. *J Hypertens* 1996; 14:389-397.
- Bertolino F, Valentin JP, Maffre M, Jover B, Bessac AM, John G. Prevention of thromboxane A<sub>2</sub> receptor-mediated pulmonary hypertension by a nonpeptide angiotensin II type 1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268:747-752.
- Best LC, Martin TJ, Russel RGG, Preston FE. Prostacyclin increases cyclic AMP activity in platelets. *Nature* 1977; 267:850-852.
- Bevan RD. Effect of sympathetic denervation on smooth muscle cell proliferation in the growing rabbit ear artery. *Circ Res* 1975; 37:14-19.
- Bhambi B, Eghbali M. Effect of norepinephrine on myocardial gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment. *Am J Pathol* 1991; 139:1131-1142.
- Biollaz J, Brunner HR, Gavras I, Waeber B, Gavras H. Antihypertensive therapy with MK 421: Angiotensin II-renin relationships to evaluate efficacy of converting enzyme blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:966-972.
- Black MJ, Bertram JF, Campbell JH, Campbell GR. Angiotensin II induces cardiovascular hypertrophy in perindopril-treated rats. *J Hypertens* 1995; 13(6):683-692.
- Blaes N, Boissel J-P. Growth-stimulating effect of catecholamines on rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cell Physiol* 1983; 116:167-172.
- Blair West JR, Reid IA, Ganong WF. Stimulation of angiotensinogen release by raised blood angiotensin concentration in the dog. *Clin Sci Mol Med* 1978; 46:665.
- Blumberg AI, Nishikawa K, Denny SE, Marshall GR, Needleman P. Angiotensin (AI,II,III) receptors characterization . Correlation of prostaglandin release with peptide degradation. *Circ Res* 1977; 41:154-158.
- Boarder MR, Marriot DB. Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromoaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(suppl 5):S223-S224.
- Bohr DF. Reactivity of vascular smooth muscle from normal and hypertensive rats: Effect of several cations. *Fed Proc* 1974; 33:127-132.
- Boussairi EH, Sacquet J, Sassard J, Benzoni D. Thromboxane A<sub>2</sub>-prostaglandin H<sub>2</sub> and renovascular hypertension in rats. *Am J Physiol* 1994; 267:R1190-R1197.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347:768-770.
- Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996; 27:523-528.

Brunkwall J, Bergquist D, Stjernquist U. Prostacyclin and thromboxane release from vessel wall- Comparison between an incubation and perfusion model. *Prostaglandins* 1987; 34:467-476.

Brunner F, Kukovetz WR. Postischemic antiarrhythmic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors: role of suppression of endogenous endothelin secretion. *Circulation* 1996; 94:1752-1761.

Buckley JP, Ferrario CM. Brain peptides and catecholamines in cardiovascular regulation. New York, Raven Press 1987.

Buhler FR, Kiowski W, VanBrummelen P, Amann FW. Berta and cardiac, renal and peripheral vascular adrenoceptor mediated responses indifferent age groups of normal and hypertensive subjects. *Clin Exp Hypertens* 1980; 4:233-238.

Bunkenburg B, Amelsvoort T, Rogg H, Wood JM. Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 20:746-754.

Bunkenburg B, Schnell C, Baum HP, Cumin F, Wood JM. Prolonged angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats: Haemodynamic and biochemical consequences. *Hypertension* 1991; 18:278-288.

Bunting S, Gryglewski RJ, Moncada S, Vane RJ. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance prostaglandin enoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* 1976; 12:897-913.

Burnier MG, Centeno E, Grozmann P, Walker B, Waemer B, Brinner H. In vitro effects of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist on human platelets and rat vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 1991; 4:438-443.

Burton J, Haber E, Poulsen K. The desing of effective renin inhibitors. *Peptides: chemistry, structure and biology*. Walter and Meienhofer. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor 1975.

Byyny RL. Hypertension in the elderly. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Laragh JH and Brenner BM (eds). Raven Press 1995; 227-251.

Cachofeiro V, Sakakibara T, Nasjletti A. Kinins, nitric oxide, and the hypotensive effect of captopril and ramiprilat in hypertension. *Hypertension* 1992; 19:138-145.

Cachofeiro V, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruilope LM, Lahera V. Nitric oxide and prostaglandins in the prolonged effects of losartan and ramipril in hypertension. *Hypertension* 1995; 26:236-243.

Camargo MJF, VonLutterotti N, Campbell WG Jr, James GD, Pecker MS, Laragh JH. Abnormal relationship between ANF and PRA in stroke-prone SHR (SHRsp) is corrected by angiotensin II (AII) antagonism. *An J Hypertens* 1991 4(2):84A.



- Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension* 1994; 23:439-449.
- Carretero OA, Miyazaki S, Scicli AG. Role of kinins in the acute antihypertensive activity of the converting enzyme inhibitor, captopril. *Hypertension* 1981; 3:18-22.
- Castellion AW, Fulton RW. Preclinical pharmacology of saralasin. *Kidney Int* 1979; 15:S11-S19.
- Cavallero C, Di Tondo U, Mingazzini PL, Pesando PC, Spagnoli LG. Cell proliferation in the atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits: Part 2. Histological, ultrastructural, and radioautographic observations on epinephrine-treated rabbits. *Atherosclerosis* 1973; 17:49-62.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:471-476.
- Cirillo R, Renzetti AR, Cucchi P, Guelfi M, Salimbeni A, Caliari S, Castellucci A, Evangelista S, Subissi A, Giachetti A. Pharmacology of LR-B/081, a new highly potent, selective and orally active, nonpeptide angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 1995; 114:1117-1124.
- Clozel J-P, Kuhn H, Hefti F. Decreases of vascular hypertrophy in four different types of arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am J Med* 1989; 87:92S-95S.
- Clozel M, Kuhn H, Hefti F. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 16:532-540.
- Cogan MG, Xie MH, Liu FY, Wong PC, Timmermans PBMWM. Effects of DuP 753 on proximal nephron and renal transport. *Am J Hypertension* 1991; 4:315S-320S.
- Cohen M, Berkowitz BA. Vascular contraction: effect of age and extracellular calcium. *Blood Vessels* 1976; 13:139-154.
- Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Inhibitor role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983; 221:272-274.
- Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: Beyond nitric oxid and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92:3337-3349.
- Collis MG, Vanhoutte PM. Increased renal vascular reactivity to angiotensin II but not to nerve stimulation or exogenous norepinephrine in renal hypertensive rats. *Circ Res* 1978; 43:544-552.
- Cornish KG, Joyner WL, Gilmore JP. Direct evidence for the presence of a different converting enzyme in the hamster cheek pouch. *Circ Res* 1979; 44:540-544.
- Corriu C, Bernard S, Schott C, Stoclet JC. Effects of losartan on contractile responses of conductance and resistance arteries from rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:688-692.
- Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1996; 119(5):959-964.

- Craven PA, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide and related activators by heme and hemeproteins: Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978; 253:8433-8443.
- Chan DP, Sandok EK, Aarhus LL, Heublein DM, Burnett JC Jr. Renal specific actions of angiotensin II receptor antagonism in the anesthetized dog. *Am J Hypertens* 1992; 5:354-360.
- Cheng JB, Shibata S. Pressor responses to 5-hydroxytryptamine, norepinephrine and KCl in the perfused hindquarter preparation from the spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 214:488-495.
- Chevalier B, Heudes D, Heymes C, Basset A, Dakhli T, Bansard Y, Jouquey S, Hamon G, Bruneval P, Swynghedauw B. Trandolapril decreases prevalence of ventricular ectopic activity in middle-aged SHR. *Circulation* 1995; 92(7):1947-1953.
- Chinellato A, Pandolfo L, Ragazzi E. Effect of age on rabbit aortic responses to relaxant endothelium-dependent and endothelium-independent agents. *Blood Vessels* 1991; 28:358-365.
- Chiu AT, McCall DE, Price WA, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, Timmermans PBMWM. In vitro pharmacology of DuP 753. *Am J Hypertension* 1991; 4:282S-287S.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998; 31:643-648.
- Chua BHL, Chua CC, Diglio CA, Siu BB. Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178:201-206.
- d'Uscio LV, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF. Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1997; 29(part 2):435-441.
- Daemen MJAP, De Mey JGR. Regional heterogeneity of arterial structural changes. *Hypertension* 1995; 25:464-473.
- Davi G, Averna M, Catalano I, Barbagallo C, Ganci A, Notarbartolo A, Ciabattini G, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992; 85:1792-1798.
- De Mey JG, Gray SD. Endothelium-dependent reactivity in resistance vessels. *Prog Appl Microcirc* 1985; 88:181-187.
- De Chastonay C, Gabbiani G, Elemer G, Hüttner I. Remodeling of the rat aortic endothelial layer during experimental hypertension: Changes in replication rate, cell density, and surface morphology. *Lab Invest* 1983; 48:45-52.
- Dellipizzi A, Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Natriuretic actions of angiotensin-(1-7). *Br J Pharmacol* 1994; 11:1-3.

- DeNicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest* 1992; 89:1248-1256.
- Desaulles E, Miesch F, Schwartz J. Evidence for the participation of beta<sub>1</sub>-adrenoceptors in isoprenaline-induced renin release from rat kidney slices in vitro. *Br J Pharmacol* 1978; 63:421-425.
- Diederich D, Yang Z, Bülehr FR, Lüscher TF. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve the cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol* 1990; 258:H445-H451.
- Docherty JR. Cardiovascular responses in ageing: A review. *Pharmacol Rev* 1990; 42:103-125.
- Dohi Y, Thiel MA, Büler FR, Lüscher TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension* 1990; 15:170-179.
- Dohi Y, Hahn AWA, Boulanger CM, Bühler FR, Lüscher TF. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 1992; 19:131-137.
- Dohi Y, Criscione L, Pfeiffer K, Lüscher TF. Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: Studies in perfused mesenteric resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:372-379.
- Dohi Y, Lüscher TF. Endothelin in hypertensive resistance arteries. Intraluminal and extraluminal dysfunction. *Hypertension* 1991; 18:543-549.
- Dohi Y, Lüscher TF. Aging differentially affects direct and indirect actions of endothelin-1 in perfused mesenteric arteries of the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 100:889-93.
- Dostal DE, Baker KM. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT-1 receptor. *Am J Hypertens* 1992; 5:276-280.
- Dubey RK, Overbeck HW. Culture of mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of PDGF, angiotensin II, and nitric oxide on growth. *Cell Tissue Res* 1994; 275:133-141.
- Duckles SP. Age-related changes in adrenergic neuronal function of rabbit vascular smooth muscle. *Neurobiol Aging* 1983; 4:151-156.
- Duckles SP, Carter BJ, Willians CL. Vascular adrenergic-neuroeffector function does not decline in aged rats. *Circ Res* 1985; 56:109-116.
- Duggan J, Kilfeater S, O'Brien E, O'Malley K, Nussberger J. Effects of aging and hypertension on plasma angiotensin II and platelet angiotensin II receptor density. *Am J Hypertens* 1992; 5:687-693.
- Dunn FG, Oigman W, Ventura HO, Messerli FH, Kobrin I, Frohlich ED. Enalapril improves systemic and renal hemodynamics allows regression of left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Cardiol* 1984; 53:105-108.

Dunn WR, McGrath JC, Wilson VG. Influence of angiotensin on the  $\alpha$ -adrenoceptors involved in mediating the response to sympathetic nerve stimulation in the rabbit isolated distal saphenous artery. *Br J Pharmacol* 1991; 102:10-12.

Dutka DP, Olivotto I, Ward S, Nihoyannopoulos P, al-Subaili M, Oakley CM, Impallomeni M, Cleland JG. Plasma neuro-endocrine activity in very elderly subjects and patients with and without heart failure. *Eur Heart J* 1995; 16(9):1223-1230.

Dyer Sm, Taylor DA, Bexis S, Hime NJ, Frewin DB, Head RJ. Identification of a nonendothelial cell thromboxane-like constrictor response and its interaction with the renin-angiotensin system in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 1994; 31(1):52-60.

Dzau VJ, Re RN. Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* 1987; 75:1131-1136.

Dzau VJ, Kopelman RI, Barger CA, Haber E. Renin-specific antibody for study of cardiovascular homeostasis. *Science* 1980; 207:1091-1093.

Dzau VJ. Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension* 1986; 8:553-559.

Dzau V, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens* 1993; 11(suppl 3):S13-S18.

Dzau VJ. Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation: a hypothesis. *Am J Med* 1984; 77(4A):31-36.

Dzau VJ. Mechanism of action of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in hypertension and heart failure: role of plasma versus tissue ACE. *Drugs* 1990; 39(suppl 2):11-16.

Eccleston-Joyner CA, Gray SD. Arterial hypertrophy in the fetal and neonatal spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1988; 12:513-518.

Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993; 88(1):77-81.

Eglème C, Cressier F, Wood JM. Local formation of angiotensin II in the rat aorta: effect of endothelium. *Br J Pharmacol* 1990; 100:237-240.

Enggürd EE, Botting RM, Vane JR. Endothelins. *Blood Vessels* 1990; 27:269.

Erdős EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension* 1990; 16:363-370.

Esler M, Skews H, Leonard P, Jackson G, Bobik A, Korner P. Age-dependence of noradrenaline kinetics in normal subjects. *Clin Sci* 1981; 60:217-219.

Farivar RS, Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Effect of angiotensin II blockade on the fibroproliferative response to phenylephrine in the rat heart. *Hypertension* 1995; 25(part 2):809-813.

Featherstone LA, Veith RC, Flatness D, Murburg MM, Villacres EC, Halter JB. Age and alpha-2 adrenergic regulation of plasma norepinephrine kinetics in humans. *J Gerontol* 1987; 42:271-276.

Feletou M, Moreau N, Boulanger M. Effect of aging and drug-induced weight reduction on rat vascular reactivity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21:120-127.

Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93:515-524.

Filippelli A, Palla A, Lampa E. Aging and in vitro vascular responses to endothelin-1 in several rat strains. *Pharmacol Res* 1993; 28:193-202.

Fleming WW. Membrane potential and vascular smooth muscle sensitivity. *Blood Vessels* 1987; 24:108-112.

Folger WH, Lawson D, Wilcox CS, Mehta JL. Response of the thoracic aorta rings to thromboxane mimetic U-46619: Roles of endothelium-derived relaxing factor and thromboxane A<sub>2</sub> release. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258:669-675.

Folkow B, Hallback M, Lundgrun Y, Siverston Weiss L. Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension studied in man and in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1973; 32(suppl 1):2.

Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 1990; 16:89-101.

Folkow B, Svanborg A. Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev* 1993; 73:725-763.

Frishman WH. Epidemiology, pathophysiology and management of isolated systolic hypertension in the elderly. *Am J Med* 1991; 90(suppl 4B):S21-S27.

Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1992; 70:660-669.

Fujii K, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Ohya Y, Kobayashi K, Fujishima MM. Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 1993; 265:H509-H516.

Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrate: basis for the proposal that the acid-activatable component of the inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrate and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. Mechanisms of vasodilation. Vanhoutte PM (ed). New York, Raven Press, 1988; 401-414.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factors and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-2018.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 299:373-376.

Gagnon DJ, Gautier R, Regoli D. Release of prostaglandins from the rabbit perfused kidney: effects of vasoconstrictors. *Br J Pharmacol* 1974; 50:553-558.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-1777.

Gavras H, Kremer D, Brown J, Gray B, Lever A, Macadan R, Medina A, Morton J, Robertson JS. Angiotensin and norepinephrine-induced myocardial lesions: experimental and clinical studies in rabbits and man. *Am Heart J* 1975; 89:321-332.

Gavras H, Brunner HR, Laragh JF, Sealey JE, Gavras I, Vukovich RA. An angiotensin converting inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N Engl J Med* 1974; 291:817-827.

Gerrity RG, Cliff WJ. The aortic intima in young and aging rats. *Exp Mol Pathol* 1972; 16:382-402.

Gillies LK, Lu M, Wang H, Lee RMKW. AT<sub>1</sub> receptor antagonist treatment caused persistent arterial functional changes in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30:1471-1478.

Girerd X, Mourad J-J, Copie X, Moulin C, Acar C, Safar M, Laurent S. Noninvasive detection of an increased vascular mass in untreated hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1994; 7:1076-1084.

Gohlke P, Lamberty V, Kuwer I, Bartenbach S, Schnell A, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Unger T. Long-term low-dose angiotensin converting enzyme inhibitor treatment increases vascular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertension* 1993; 22:682-687.

Gohlke P, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Unger T. Cardiac and vascular effects of long-term losartan treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28:397-402.

Gohlke P, Stoll M, Lamberty V, Mattfeld T, Mall G, Van Even P, Martorana P, Unger TH. Cardiac and vascular effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition at subantihypertensive doses. *J Hypertens* 1992; 10(suppl 6):S141-S144.

Goldberg MR, Tanaka W, Barchowsky A, Bradstreet TE, Lo MW, McWilliams EJ, Bjornsson TD. Effects of losartan on blood pressure, plasma renin activity, and angiotensin II in volunteers. *Hypertension* 1993; 21:704-713.

Goldblatt H, Katz YJ, Lewis HA, Richardson E. Studies on experimental hypertension. Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934; 99:275-282.

Goldstein DS, Lake CR, Chernew B. Age dependence of the hypertensive-normotensive differences in plasma norepinephrine. *Hypertension* 1983; 5:100-107.

Goodfriend TL. Angiotensin receptors and specific functions of angiotensin I, II and III en *Hypertension: Physiopathology and treatment*. J Genes et al (Eds.) Mc Graw-Hill C. New York., 1983; 279.

Gray SD. Spontaneous hypertension in the neonatal rat: a review. *Clin Exp Hypertens*. 1984; A6:755-781.

Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J, Tannenbaum S. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.

Griendling K, Ollerenshaw JD, Minieri CA, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Cir Res* 1994; 74:1141-1148.

Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of the endothelium-derived relaxant factor. *Nature* 1984; 308:645-647.

Gruetter CA, Ryan, ET, Lemke SM, Bailly DA, Fox K, Schoepp DD. Endothelium-dependent modulation of angiotensin II-induced contraction in blood vessels. *Eur J Pharmacol* 1988; 146:85-95.

Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26(part I):854-857.

Gryglewski RJ. Prostacyclin in vascular disease. En "Biological Protection with Prostaglandins, vol. 1. Cohen MM, eds. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc. 1985. 145-168.

Gryglewski RJ. Prostaglandins, platelets and atherosclerosis en. *CRC Critical Review on Biochemistry*. JD Fasman (Ed.) CRC Press Inc. New York. 1980; 291.

Guan H, Cachofeiro V, Pucci ML, Kaminski PM, Wolin MS, Nasjletti A. Nitric oxide and the depressor response to angiotensin blockade in hypertension. *Hypertension* 1996; 27:19-24.

Gunther S, Gimbrone MA, Alexander RW. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 1980; 287:230-232.

Guyton AC, Jones CE, Coleman TG. *Cardiac output and its regulation*. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1973.

Hadju MA, McElmurry RT, Heistad DD. Effect of aging on cerebral vascular responses to serotonin in rats. *Am J Physiol* 1993; 264:H2136-H2140.

Hahn AWA, Resink TJ, Kern F, Büler FR. Peptide vasoconstrictors, vessel structure and vascular smooth-muscle proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(suppl 5):S37-S42.

Hall JE. Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanism and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1986b; 250:R960-R972.

Hall JE, Guyton AC, Smith MJ, Coleman TG. Long-term regulation of arterial pressure, glomerular filtration and renal sodium by angiotensin II in dogs. *Clin Sci* 1980; 59:87S-90S.

Hall JE. Regulation of glomerular filtration rate and sodium excretion by angiotensin II. *Federation Proc* 1986a; 45:1431-1437.

Hallbäck-Nordlander M. Left/Right ventricular weight ratio: An estimate of cardiac adaptation to hypertension. *Clin Sci* 1980; (Suppl 59) 415s.

Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW. Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol* 1996; 270:F141-F147.

Hano T, Mizukoshi M, Baba A, Nakamura N, Nishio I. Angiotensin II subtype I receptor modulates epinephrine release from isolated rat adrenal gland. *Blood Pressure* 1994; 3(suppl 5):105-108.

Haudenschild CC, Chobanian AV. Blood pressure lowering diminishes age-related changes in the aortic intima. *Hypertension* 1984; 6(Suppl I):I62-I68.

Haudenschild CC, Prescott MF, Chobanian AV. Aortic endothelial and subendothelial cells in experimental hypertension and aging. *Hypertension* 1981; 3(Suppl I):I-148-I-153.

Hauss WH, Mey J, Schulte H. Effect of risk factors and antirheumatic drugs on the proliferation of aortic wall cells. *Atherosclerosis* 1979; 34:119-143.

Hayakawa H, Raij L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 1997; 29(part 2): 235-241.

Hayashi S, Toda N. Age-related changes in the response of rabbit isolated aortae to vasoreactive agents. *Br J Pharmacol* 1978; 64:229-237.

Hayoz D, Nussberger J, Waeber B, Brunner HR. The renin-angiotensin system and arterial wall behavior. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(suppl 5):S48-S52.

Heagerty AM. Angiotensin II: Vasoconstrictor or growth factor?. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18(suppl 2): S14-S19.

Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvalny MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993; 21:391-397.

Heim KF, Thomas G, Ramwell PW. Effect of substituted arginine compound on nitric oxide production in the rabbit aortae. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257(3):1130.

Herrmann HC, Dzau VJ. The feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin angiotensin system. *Circ Res* 1983; 52:328.

Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Higsmitn RF. Characterization of coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248:C550-C556.



- Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I<sub>2</sub> release. *Hypertension* 1995; 25:1238-1244.
- Himeno H, Crawford DC, Hosoi M, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II alters aortic fibronectin independently of hypertension. *Hypertension* 1994; 23(2):823-826.
- Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K, Sakakibara S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154:868-875.
- Hirata Y, Yoshimi H, Takaichi S, Yanagisawa M, Masaki T. Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin-1 in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; 239:13-17.
- Hogikyan RV, Supiano MA. Arterial alpha-adrenergic responsiveness is decreased and SNS activity is increased in older humans. *Am J Physiol* 1994; 266(1):E717-E724.
- Hollemborg NK, Douglas FA, Solomon HS, Rashid A, Abrams HL, Merrill J. Senescence and the renal vasculature in normal man. *Circ Res* 1974; 34:309-316.
- Holloway ET, Bohr DF. Reactivity of vascular smooth muscle in hypertensive rats. *Circ Res* 1973; 33:678-685.
- Hughes AD, Sinclair A-M, Geroulakos G, Mayet J, Mackay J, Shahi M, Thom S, Nicolaidis A, Sever PS. Structural changes in the heart and carotid arteries associated with hypertension in humans. *J Hum Hypertens* 1993; 7:395-397.
- Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *J Hypertension* 1993; 11:1155-1159.
- Hyland L, Docherty JR. An investigation of age-related changes in pre- and post-junctional alpha-adrenoreceptors in human saphenous veins. *Eur J Pharmacol* 1985; 110:241-246.
- Hynes MR, Duckles SP. Effect on increasing age on the endothelium-mediated relaxation of rat blood vessels in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 241:387-392.
- Ignarro RJ, Burke TM, Wood KS, Wolin MS, Kadowitz PJ. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228:682-690.
- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadiwiz PJ, Grueter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218:739-749.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. Vanhoutte, PM, ed. *Mechanisms of vasodilatation*. New York, Raven Press, 1988; 427-435.

Ikeda M, Kohno M, Takeda T. Endothelin production in cultured mesangial cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25:1196-1201.

Ingerman-Wojensky C, Silver MJ, Smith JB, Macarak E. Bovine endothelial cells in culture produce thromboxane as well as prostacyclin. *J Clin Invest* 1981; 67:1292-1296.

Ishiyama M, Umemura K, Uematsu T, Nakashima M. Angiotensin AT1 receptor-mediated attenuation of cardiac hypertrophy due to volume overload: involvement of endothelin. *Eur J Pharmacol* 1995; 280:11-17.

Ishimitsu T, Uehara Y, Ishii M, Sugimoto T. Enhanced generation of vascular thromboxane A<sub>2</sub> in spontaneously hypertensive rats and its role in the rapid proliferation of vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 1988a; 1:38S-40S.

Ishimitsu T, Uehara Y, Ishii M, Ikeda T, Matsuoka H, Sugimoto T. Thromboxane and vascular smooth muscle cell growth in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1988b; 12:46-51.

Israel A, Strömberg C, Tsutsumi K, Garrido MR, Torres M, Saavedra JM. Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla. *Brain Res Bull* 1995; 38:441-446.

Israilli ZH, Hall WD. ACE inhibitors. Differential use in elderly patients with hypertension. *Drugs Aging* 1995; 7(5):355-371.

Ito S, Carretero OA. Impaired response to acetylcholine despite intact endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in isolated microperfused afferent arterioles of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20(suppl 12):S190-S192.

Ito H, Torii M, Suzuki T. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Clin. And Exper. Hypertension* 1995; 17(5):803-816.

Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993; 92:398-403.

Ito S, Johnson CS, Carretero OA. Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 1991; 87:1656-1663.

Iwama Y, Kato T, Muramatsu M, Asano H, Shimizu K, Toki Y, Miyazaki Y, Okamura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Correlation with blood pressure of the acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 1992; 19:326-332.

Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1998; 31(2):356-361.

Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. *Hypertension* 1992; 19(suppl II):II-49-II-55.

- Jaiswal N, Diz DI, Tallant EA, Khosla MC, Ferrario CM. The nonpeptide angiotensin II antagonist DuP 753 is a potent stimulus for prostacyclin synthesis. *Am J Hypertens* 1991; 4(suppl 3):228-233.
- Jakobs HK, Saur W, Schultz G. Reduction of adenylate cyclase activity in lysates of human platelets by the  $\alpha$ -adrenergic component of epinephrine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1976; 2:381-392.
- Jie K, Van Brummelen P, Vermey P, Timmermans PBMWM, van Zwieten PA. Alpha1- and alpha2-adrenoceptor mediated vasoconstriction in the forearm of normotensive and hypertensive subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8:190-196.
- Kähönen M, Mäkynen H, Wu X, Arvola P, Pörsti I. Endothelial function in spontaneously hypertensive rats: influence of quinapril treatment. *Br J Pharmacol* 1995; 115:859-867.
- Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD. Angiotensin II receptor Type-1 cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183:1090.
- Kamata K, Chikada S, Umeda F, Kasuya Y. Effects of phorbol ester on vasodilation induced by endothelium-dependent or endothelium-independent vasodilators in the mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26(4):645-652.
- Kanagy NL, Pawloski CM, Fink GD. Role of aldosterone and angiotensin II induced hypertension in rats. *Am J Physiol* 1990; 259:R102-R109.
- Kaneko K, Susic D, Nuñez E, Frohlich ED. Losartan reduced cardiac mass and improve coronary flow reserve in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1996; 14:645-653.
- Kannel WB. Hypertension and other risk factors in coronary heart disease. *Am Heart J* 1987; 114:918-925.
- Karaki H, Weiss GB. Calcium release in smooth muscle. *Life Sci* 1988; 42:111-122.
- Kariya K, Kawahara Y, Araki S, Fukuzaki H, Takai Y. Antiproliferative action of cyclic GMP-elevating vasodilators in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1989; 80:143-147.
- Katano Y, Ishihata A, Morinobu S. Modulation by aging of the coronary vascular response to endothelin-1 in the rat isolated perfused heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 348:82-87.
- Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Prostaglandin H<sub>2</sub> may be the endothelium-derived constrictor factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1990; 15:475-481.
- Katusic ZS, Cosentino F. Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular physiology. *NIPS* 1994; 9:64.

Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to stretch in canine basilar arteries. *Am J Physiol* 1987; 252:H671.

Kawaguchi H, Kitabatake A. Altered signal transduction system in hypertrophied myocardium: angiotensin II stimulates collagen synthesis in hypertrophied hearts. *J Card Fail* 1996; 2(4 suppl) 13-19.

Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H. Effect of endothelin on angiotensin convertin enzyme activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Hypertens* 1991; 9:171-174.

Keidar S, Brook JG, Aviram M. Angiotensin II enhances lipid peroxidation of low-density lipoprotein. *NIPS* 1993; 8:245-248.

Khairallah PA. Action of angiotensin on adrenergic nerve endings: inhibition of norepinefrine uptake. *Federation Proc* 1972; 31:1351-1357.

Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res* 1987; 60:422-428.

Kimura S, Kasuya Y, Kawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships in big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(Suppl 5):S5-S12.

Kitami Y, Okura T, Wakamiya R, Marumoto K, Iwata T, Hiwada K. Regulation of the gene expression of type-1 angiotensin II receptor in spontaneously hypertensive rats. *Blood press Suppl* 1992; 3:12-16.

Knothe CH, Boldt J, Zickmann B. Endothelin plasma levels in old and young patients during open heart surgery: correlations to cardiopulmonary and endocrinology parameters. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:664-670.

Ko Y, Görg A, Apenheimer M, Wiczorek AJ, Dusing R, Vetter H, Sachinidis A. Losartan inhibits the angiotensin II induced stimulation of the phosphoinositide signalling system in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1992; 277:215-219.

Koga T, Takata Y, Kobayashi S, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1988; 6(suppl 4):S243-S245.

Koga T, Takata, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1989; 14:542-548.

Kohara K, Brosnihan KB, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Peptides* 1993; 14:883-891.

- Kohno M, Horio T, Ikeda M, Yokokawa K, Fukui T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1992; 42:860-866.
- Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; 238:249-252.
- Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1993; 55:55-75.
- Kon V, Badr KF. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. *Kidney Int* 1991; 40:1.
- Konieczkowski M, Dunn MJ, Stork JE, Hassid A. Glomerular synthesis of prostaglandins and thromboxane in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1983; 5:446-452.
- Konstam MA, Rousseau MF, Kronenberg MW, Udelson JE, Melin J. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. *Circulation* 1992; 86:431-438.
- Kost CK, Jackson EK. Enhanced renal angiotensin II subtype 1 receptor responses in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1993; 21:420-431.
- Kromer EP, Riegger AJ. Effects of long-term angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial hypertrophy in experimental aortic stenosis in the rat. *Am J Cardiol* 1988; 62:161-163.
- Küng CF, Lüscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 1995; 25:194-200.
- Kuroda K, Fukuda Y, Nakao K, Inukai T. Antihypertensive mechanism of action of the novel angiotensin converting enzyme inhibitor benazepril. Effect on isolated vascular preparations. *Arzneimittelforschung* 1990; 40(9):968-973.
- Kuttan SC, Sim MK. Actions of norepinephrine and angiotensin II on aortic rings of adult and aged normotensive and hypertensive rats. *Cardiovasc Pharmacol* 1993a; 21(3):371-375.
- Kuttan SC, Sim MK. Angiotensin II-Induced tachyphylaxis in aortas of normo- and hypertensive rats: changes in receptor affinity. *Eur J Pharmacol* 1993b; 232(2-3):173-180.
- Lahera V, Khraibi AA, Romero JC. Sulfhydryl group donors potentiate the hypotensive effect of acetylcholine in rats. *Hypertension* 1993; 22:156-160.
- Lahera V, Navarro-Cid J, Cachofeiro V, García-Estaño J, Ruilope LM. Nitric oxide, the kidney and hypertension. *Am J Hypertens* 1997; 10:129-140.
- Lang M, Noll G, Luscher TF. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: modulation by endothelial factors. *Am J Physiol* 1995; 269:H837-H844.

- Langille BL. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle and matrix. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21(suppl 1):11-17.
- Laragh JH, Baer L, Brunner HR. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *Am J Med* 1972; 52:633-652.
- Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 21:294-300.
- Lee RMKW, Berecek KH, Tsoporis J, McKenzie R, Triggle CR. Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. *Hypertension* 1991; 17:141-150.
- Lee RMKW, Triggle CR, Cheung DWT, Coughlin MD. Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987; 10:328-338.
- Lee RM, Conyers RB, Kwan CY. Incidence of multinucleated and polyploid aortic smooth muscle cells cultured from different age groups of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1992 70(11):1496-1501.
- Lefkowitz RJ, Stadel JM, Caron MG. Adenylate cyclase coupled  $\beta$ -adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. *Annu Rev Biochem* 1985; 52:159-186.
- Lever AF, Lyall F, Morton JJ, Folkow B. Angiotensin II, vascular structure and blood pressure. *Kidney Int* 1992; 41(suppl 37):S51-S55.
- Li P, Ferrario CM, Brosnihan KB. Nonpeptide angiotensin II antagonist losartan inhibits thromboxane A<sub>2</sub>-induced contractions in canine coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1997b; 281:1065-1070.
- Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT<sub>1</sub> angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovas Pharmacol* 1997a; 30:75-83.
- Lilly LS, Pratt RE, Alexander RW. Renin expression by vascular endothelial cells in culture. *Circ res* 1985; 57:312-318.
- Lin L, Mistry M, Stier CT, Nasjletti A. Role of prostanoids in renin-dependent and renin-independent hypertension. *Hypertension* 1991; 17:517-525.
- Lin L, Nasjletti A. Role of endothelium-derived prostanoid in angiotensin-induced vasoconstriction. *Hypertension* 1991; 18:158-164.
- Linder L, Kiowski W, Bühler FRR, Lüscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: blunted response in essential hypertension. *Circulation* 1990; 81:1762-1767.

Liu ECK, Hedberg A, Goldenberg HJ, Harris DN, Webb ML. Dup 753, the selective angiotensin II receptor blocker, is a competitive antagonist to human platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> (TP) receptors. *Prostaglandins* 1992; 44:89-99.

Lograno MD, Daniele E, Galli C. Changes of vascular smooth muscle reactivity in hypertensive rats. *Pharmacol Res* 1989; 21:719-728.

Luft FC, Wilcox CS, Unger T, Kühn R, Demmert G, Rohmeiss P, Ganten D, Sterzel RB. Angiotensin-induced hypertension in the rat: sympathetic nerve activity and prostaglandins. *Hypertension* 1989; 14:396-403.

Luque M, Martin P, Martell N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM. Effects of Captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens* 1996; 14:799-805.

Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 1990; 3:55-58.

Lüscher TF, Dohi Y, Tschudi M. Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992b; 19(suppl 5):S34-S42.

Lüscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990;15:482-485.

Lüscher TF, Tanner FC, Dohi Y. Age, hypertension and hypercholesterolaemia alter endothelium-dependent vascular regulation. *Pharmacol Toxicol* 1992a; 70:S32-S39.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1986; 8:344-348.

MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Endothelin ET<sub>A</sub>-and ET<sub>B</sub>-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:838-845.

Maeso R, Navarro-Cid J, Muñoz-García R, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V. Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension* 1996; 28:967-972.

Malik KU, Nasjletti A. Facilitation of adrenergic transmission by locally generated angiotensin II in rat mesenteric arteries. *Circ Res* 1976; 38:26-30.

Malik KU. Interaction of arachidonic acid metabolites and adrenergic nervous system. *Am. J Med Sci*, 1988; 295:280-286.

Manabe K, Shirase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M: Endothelium-dependent contractions induced by angiotensin I and angiotensin II in canine cerebral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251:317-320.

Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci* 1989; 14:488-492.

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 233:708-716.

Masaki T. Endothelins: Homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *The Endocrine society* 1993; 14:256-268.

Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:235-255.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, Imaizumi T. Chronic L-Arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 27:14-18.

Mayeux PR, Morton HE, Gillard J, Lord A, Morinelli TA, Boehm A, Mais DE, Halushka PV. The affinities of prostaglandins H<sub>2</sub> and tromboxane A<sub>2</sub> for their receptor are similar in washed human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157:733-739.

Mayhan WG, Faraci FM, Baunmbach GL, Heistad DD. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol* 1990; 258:H1138-H1143.

Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD. Responses of cerebral arterioles to adenosin diphosphate, serotonin and the thromboxane analogue U-46619 during chronic hypertension. *Hypertension* 1989; 12(suppl 6):556-561.

Mehta J, Roberts A. Human vascular tissues produce thromboxane as well as prostacyclin. *Am J Physiol* 1983; 244:R839-R844.

Mento PF, Wilkes BM. Plasma angiotensins and blood pressure during converting enzyme inhibition. *Hypertension* 1987; 9(suppl III):III42-III48.

Miasiro N, Yamamoto H, Xanaide M, Nakamura M. Does endothelin mobilize calcium from intracellular store sites in rat aortic vascular smooth muscle cells in primary culture? *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 156:312.

Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, Corman B, Levy BI. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol* 1994; 267:R124-R135.

Minneman KP. Alfa1-agrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of calcium. *Pharmacol Rev* 1988; 40:87-119.

Mistry M, Nasjletti A. Contrasting effect of thromboxane synthase inhibitors and a thromboxane receptor antagonist on the development of angiotensin-salt-induced hypertension in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253:90-94.



Mistry M, Muirhead EE, Yamaguchi Y, Nasjletti A. Renal function in rats with angiotensin II-salt-induced hypertension: effect of thromboxane synthesis inhibition and receptor blockade. *J Hypertens* 1990; 8:75-83.

Mitchell JA, de Nucci G, Warner T, Vane JR. Different pattern of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol*, 1992; 105:485.

Miyauchi T, Yanagisawa M, Iida K. Age- and sex- related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects. *Am Heart J* 1992; 123:1092-1093.

Mombouli J-V, Illiano S, Nagao T, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1992; 71:137-144.

Momose N, Fukuo K, Morimoto S, Ogihara T. Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin. *Hypertension*, 1993; 21:921-924.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1978; 30:293-331.

Moriguchi A, Tallant EA, Matsumura K, Reilly TM, Walton H, Ganten D, Ferrario CM. Opposing actions of angiotensin-(1-7) and angiotensin II in the brain of transgenic hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25:1260-1265.

Morisaki N, Kanzaki T, Motoyama N, Saito Y, Yoshida S. Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin I<sub>2</sub> in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1988; 71:165-171.

Moritoki H, Yoshikawa T, Hisayama T. Possible mechanism of age related reduction of vascular relaxation caused by atrial natriuretic peptide. *Eur J Pharmacol* 1992; 210:61-68.

Moritoki H, Hosoki E, Ishida Y. Age-related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric arteric. *Eur J Pharmacol* 1986; 126:61-67.

Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T. Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 1996; 27:463-465.

Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990; 79:921-961.

Mullance KM, Moncada S. Prostacyclin release and the modulation of some vasoactive hormones. *Prostaglandins* 1980; 20:25-49.

Muñoz-García R, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruilope LM, Casal MC et al.: Acute renal excretory actions of losartan in spontaneously hypertensive rats: role of AT<sub>2</sub> receptors, prostaglandins, kinins and nitric oxide. *J Hypertens* 1995; 13:1779-1784.

Murad F, Arnold WF, Mittal CK, Braughler JM. Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1979; 11:175-204.

Murphy DD, Shepard J, Smith SG III, Stephens GA. Effects of AT<sub>1</sub> receptor antagonist losartan on angiotensin II induced hypertrophy of rats cardiomyocytes. *FASEB J* 1992; 6:A1261.

Murphy ME, Brayden JE. Apamin-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol* 1995; 489(3):723-734.

Nagano M, Higaki J, Mikami H, Ogihara T. Role of the renin-angiotensin system in hypertension in the elderly. *Blood Press Suppl* 1994; 5:130-133.

Nagura J, Hui C, Yamamoto M, Yasuda S, Abe M, Hachisu M, Konno F. Effect of chronic treatment with ME3221 on blood pressure and mortality in aged stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995 22(suppl 1):S363-S365.

Nakamaru M, Inagami T, Ogihara T, Kumahara Y. Effect of captopril on angiotensin II release from vascular tissues in rats. *Clin Exp Hypertens [A]* 1987; 9:477-480.

Nakashima M, Vanhoutte PM. Age-dependent decrease in endothelium-dependent hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1993; 22(Suppl 8):S352-S354 1993 Raven Press, Ltd., New York.

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

Nally JE, Clayton Ra, Wakeman MJO, Thomson NC, McGrath JC. Angiotensin II enhances responses to endothelin-1 in bovine bronchial smooth muscle. *Pulm Pharmacol* 1994; 7:409-413.

Naruse M, Takii Y, Inagami T. Renin exists in high concentrations in the adrenal gland of the rat. *Biomed Rev* 1981; 2:583-586.

Nasjletti A, Malik KU. Interrelations between prostaglandins and vasoconstrictor hormones: Contribution to blood pressure regulation. *Fed Proc* 1982; 41:2394-2399.

Nelson E, Arcuri K, Ikeda L, Snavely D, Sweet C. Efficacy and safety of losartan in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1992; 5:19A-22A.

Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S. Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens* 1993; 11:927-934.

Nishimura N, Takase H, Morita T. Effects of chronic losartan treatment on myocardial, vascular structure and reactivity with aging in spontaneously hypertensive rats (SHR): its effects compared with those of captopril. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1995; 105(6):479-489.

- Oddie CJ, Dilley RJ, Bobik A. Long-term angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and cardiovascular amplifiers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19(5):392-395.
- Ohlstein EH, Gellai M, Brooks DP, Vickery L, Jugus J, Sulpizio A, Ruffolo RR, Weinstock J, Edwards RM. The antihypertensive effect of the angiotensin II receptor antagonist DuP 753 may be not due solely to angiotensin II receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262:595-601.
- Okamura T, Miyazaki M, Inagami T, Toda N. Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8:560-565.
- Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 1984; 2:277-284.
- Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149:1186-1192.
- Okuno T, Kondo K, Konishi K, Saruta T, Kato E. SQ14225 attenuates the vascular response to norepinephrine in the rat mesenteric arteries. *Life Sci* 1979; 25:1343-1350.
- Oliner CM, Elliott WJ, Gretler DD, Murphy MB. Low predictive value of positive Osler's maneuver for diagnosing pseudohypertension. *J Hum Hypertens* 1993; 7:65-70.
- Olivetti G, Melisari M, Marchetti G, Anversa P. Quantitative structural changes of the rat thoracic aorta in early spontaneous hypertension. *Circ Res* 1982; 51:19-26.
- Olsen UB, Arrigoni-Martelli E. The effect of kinase II inhibition by SQ14225 on kidney kallikrein, kinin and prostaglandin system in conscious dogs. *Eur J Pharmacol* 1979; 54:229-238.
- Onesti G, Fernandes M, Kim KE. Eds. Regulation of blood pressure by the central nervous system. Grune and Shatton, New York. 1976;vol 1.
- Orehov AN, Tertov VV, Kudryashov SA, Khashimov KHA, Smirnov VN. Primary culture of human aortic intimal cells as a model for testing antiatherosclerotic drugs: Effects of cyclic AMP, prostaglandins, calcium antagonists, antioxidants, and lipidlowering agents. *Atherosclerosis* 1986; 60:101-110.
- Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC, Kadowitz PJ. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol* 1993; 234:35-42.
- Osei S, Kadowitz OJ. Comparison of the vasoconstrictor effects of angiotensin II and des-asp-1-angiotensin II in the hindquarters vascular bed of the cat. *FASEB J*, 1992; 6:1296-1299.
- Ouchi Y, Souza AC, Orimo H, Yoshizumi M, Kurihara H, Yoshio Y. Central effect of endothelin on blood pressure in conscious rats. (Abstract). *Circulation* 1988; 78:II-266.

- Owen TL. Effect of age on blood pressure and small vessel reactivity in male rabbits. *Blood Vessels* 1986; 23:271-278.
- Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1989; 257:H1755-H1765.
- Owens GK, Schwartz SM, McCanna M. Evaluation of medial hypertrophy in resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1988, 11:198-207.
- Owens GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987; 9:178-187.
- Pace-Asciak C. A new prostaglandin metabolite of arla acetylcolinaidinic acid. Formation of 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  by the rat stomachilcolina. *Experientia* 1976; 32:291-292.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333:664-666.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
- Pals DT, Masucci FE, Sipos F, Dennings GS Jr. A specific competitive antagonist of the vascular action of angiotensin II. *Circ Res* 1971b; 29:664-672.
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne RN, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87:1468-1474.
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension: evidence that the abnormality is not at the muscarinic receptor level. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1610-1616.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990; 323:22-27.
- Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanins of action. *Physiol Rev* 1977; 57:313.
- Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Am J Physiol* 1987; 49:413-435.
- Poggioli J, Lazar G, Houiller P, Gardin Jp, Achard Jm, Paillard M. Effects of angiotensin II and nonpeptide receptor antagonists on transduction pathways in rat proximal tubule. *Am J Physiol* 1992; 263:C750-C758.
- Pollock DM, Polakowski JS, Divish BJ, Opgenorth TJ. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric-oxide synthase inhibition. *Hypertension* 1993; 21:660-666.

Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol* 1994; 111:652-654.

Prewitt RL, Chen IHH, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1982; 243:H243-H251.

Purkerson ML, Martin KJ, Yates J, Kissane JM, Klahr S. Thromboxane synthesis and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8:1113-1120.

Qiu HY, Henrion D, Levy BI. Endogenous angiotensin II Enhances Phenyleprine induced tone in hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 24:317-321.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacologic of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987a; 92:181-187.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987b; 2:1057-1058.

Raij L. Mechanisms of vascular injury: the emerging role of endothelium. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:S2-S8.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison D. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.

Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, Nagano M, Higashimiri K, Mikami H, Ogihara T. Endothelin activates the vascular renin-angiotensin system in rat mesenteric arteries. *Biochem Int* 1990; 21:867-872.

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rats aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983; 306:174-176.

Re R, Fallon JT, Dzau V, Quay SC, Haber E. Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. *Life Sci* 1982; 30:99-106.

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. The role of endothelium-derived nitric-oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:3375-3378.

Rhaleb NE, Rouissi N, Nantel F, D'Orleans-Juste P, Regoli D. DuP 753 is a specific antagonist for the angiotensin receptor. *Hypertension* 1991; 17:480-484.

Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens* 1994; 7:193-200.

Roman MJ, Saba PS, Pini r, Spitzer M, Pickering TG, Rosen S, Alderman MH, Devereux RB. Parallel cardiac and vascular adaptations in hypertension. *Circulation* 1992; 86:1909-1918.

Roman MJ, Pickering TG, Pini R, Schwartz JE, Devereux RB. Prevalence and determinants of cardiac and vascular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 1995; 26:369-373.

Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:1371.

Romero JC, Knox FG. Mechanisms underlying pressure-related natriuresis: The role of the renin-angiotensin and prostaglandin systems. *Hypertension* 1988; 11:724-738.

Rosenthal JH, Pfeifle B, Michailov ML, Pschorr J, Jacob ICM, Dahlheim H. Investigations of components of the renin-angiotensin system in rat vascular tissue. *Hypertension* 1984; 6:383-390.

Roth RH. Action of angiotensin on adrenergic nerve endings: enhancement of norepinephrine biosynthesis. *Federation Proc* 1972; 31:1358-1364.

Rowland NE, Li BH, Fregly MJ, Smith GC. Fos induced in brain of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II and co-localization with AT-1 receptors. *Brain Res* 1995; 675(1-2):127-134.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hipoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H822-H827.

Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radical Biol Med* 1988; 4:107.

Rubanyi GM. Endothelin in cardiovascular homeostasis en Hypertension. Pathophysiology, diagnosis, and Management Laragh and Brenner (Eds.) Raven Press New York, 1995; 1109

Rubanyi GM, Johns A, Harrison DG, Wilcox D. Evidence that EDRF may be identical with an S-nitrosithiol and not with free nitric oxide. *Circulation* 1989; 80(Suppl II):II-281.

Rubanyi GM, Parker-Botelho LH. Endothelins. *FASEB J* 1991; 5:3713-2720.

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H1145.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia released a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364:45.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993; 73:413-423.

Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *New Engl J Med* 1990; 322:205.

Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trend Pharmacol Sci*, 1992; 13:103-108.

Samani NJ, Swales JD, Brammar WJ. Expression of the renin gene in extra-renal tissues of the rat. *Biochem J*, 1988; 254:907-910.

Sato Y, Shimada T, Takaki R. Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:1098.

Schiffrin EL, Lariviere R, Touyz RM. ETA and ETB receptors on vascular smooth muscle cells from mesenteric vessels of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22(suppl 1):S193-S194.

Scott PJW, Reid JL. The effect of age on the responses of human isolated arteries to noradrenaline. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 4:388-392.

Scott TM, Pang SC. The correlation between the development of sympathetic innervation and the development of medial hypertrophy in jejunal arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst* 1983; 8:25-32.

Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of NO by cultured aortic SMCs. Effects on cell proliferation. *Circ Res* 1992; 71:1088-1100.

Schelling P, Speck G, Unger T, Ganten D. The brain angiotensin system: biochemistry, localization and functional aspects. Parvez H, Parvez S, eds. *Advances in experimental medicine: a centenary tribute to Claude Bernard*. Amsterdam: Elsevier/North Holland 1980; 243-288.

Scheuer DA, Perrone MH. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol* 1993; 264:R917-R923.

Schiffrin EL, Deng LY. Comparison of effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and B-blockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients. *Hypertension* 1995; 25(2):699-703

Schiffrin EL, Thomé FS, Genest J. Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension* 1984; 6:682-688.

Schoemaker RG, Leenen FH, Harmsen E. Age-related increase in sensitivity for ischemic ATP breakdown in hypertrophic hearts of SHR normalized by enalapril. *J Moll Cell Cardiol* 1994; 26(5):649-660.

Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Pinto Y, Remme WJ, Jacob H, Dzau VJ. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II. *Circ Res* 1993; 72:312-318.

Sealey JE, Laragh JH. *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management*. JH Laragh y BM Brenner Eds. Raven Pres Ltd, New York 1990; 1292.

Secchi J, Lecaque D, Dunn FW, Jouquey S, Auberval UD, Benzoni F, Sirugue O, Hamon G. Effects of subchronic treatment with trandolapril and enalapril on cardiovascular morphologic alterations in the aged spontaneously hypertensive rat with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23(suppl 4):S30-S37.

Sekiguchi N, Ishii Y, Fujikura H, Hasegawa Y, Takayanagi I. Pharmacological action of levo-2S 3AR7AS-1-S-N-S-1-carbonyl-3-phenylpropylalanylhexahydro-2-indolinecarboxylic acid trandolaprilat in isolated smooth muscle preparations. *Gen Pharmacol* 1993; 24(3):585-590.

Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Coronary kinin generation mediated nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension* 1995; 26:164-170.

Shibouta Y, Terashita Z, Inada Y, Nishikawa K, Kikuchi S. Enhanced thromboxane A<sub>2</sub> synthesis in the kidney of spontaneously hypertensive rats during development of hypertension. *Eur J Pharmacol* 1981; 70:247-256.

Sim MK, Radhakrishnan R. In vivo of angiotensin II tachyphylaxis in freely moving normo- and hypertensive rats. *Pharmacol Toxicol* 1994; 74(4-5):223-227.

Simpson PC, Karns LR, Long CS. An approach to the molecular regulation of cardiac myocyte hypertrophy. Chien S, ed. *Molecular Biology of the Cardiovascular System*. Malvern, Pa: Lea & Febiger (ed); 1990:53-81.

Smith RD, Chiu AT, Wong PC, Herblin WF, Timmermans PBMWM. Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32:135-165.

Song K, Kurobe Y, Kanehara H, Wada T, Inada Y, Nishikawa K, Miyazaki M. Mapping of angiotensin II receptor subtypes in peripheral tissues of spontaneously hypertensive rats by in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22(suppl1):S17-S19.

Stadman TC. Protein oxidation and aging. *Science* 1993; 257:1220-1224.

Stahl RAK, Helmchem U, Paravicini M, Ritter LJ, Schollmeyer P. Glomerular prostaglandin formation in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 1984; 247:F975-F981.

Stoll M, Stecklings M, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95:651-657.

Su SM, Swamy VC, Triggle DJ. Calcium channel activation in vascular smooth muscle by BAY K 8644. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62:1401-1410.

Sventek P, Li JS, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 27:49-55.

Tabernero A, Vila E. Effect of age on noradrenaline responses in rat tail artery and aorta: role of endothelium. *J Auton Pharmacol* 1995; 15(5):327-333.



- Taddei S, Vanhoutte PM. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 1993a; 21:9-15.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human essential hypertension. *Hypertension* 1993b; 21:929-933.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 1995; 91(7):1981-1987.
- Taguchi J, Abe J, Okazaki H, Takuwa Y, Kurokawa K. L-arginine inhibits neointimal formation following balloon injury. *Life Sci* 1993; 53:PL387-PL392.
- Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade. Effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 1997; 30:1621-1627.
- Tank JE, Vora JP, Houghton DC, Anderson S. Altered renal vascular responses in the aging rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 266:F942-F948.
- Tarazi RC, Sen S. Renin and cardiac hypertrophy. *Clin Res* 1972; 20:772. Abstract.
- Tesfamariam B, Ogletree ML. Dissociation of endothelial cell dysfunction and blood pressure in SHR. *Am J Physiol* 1995; 269:H189-H194.
- Tesfamariam B, Halpern W. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension* 1988; 11:440-444.
- Thollon C, Kreher P, Charlton V, Rossi A. Hypertrophy induced alteration of action potential and effects of inhibition of angiotensin converting enzyme by perindopril in infarcted rat heart. *Cardiovasc Res* 1989; 23:224-230.
- Thompson LP, Weiner CP. Endothelium-derived relaxing factor inhibits norepinephrine contraction of fetal guinea pig arteries. *Am J Physiol* 1993; 264(33):H1139-H1145.
- Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12:55-62.
- Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45:205-251.
- Tobian L, Tomboulian A, Janecek J. The effect of high perfusion pressure on the granulation of yuxtaglomerular cells in an isolated kidney. *J Clin Invest* 1959; 38:605-610.
- Toda N, Shimizu I. Neuroeffector function in mesenteric arteries isolates from beagles of different ages. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240:223-227.

- Toda N, Shimizu I, Okamura T, Miyazaki M. Age-dependent changes in the response of isolated beagle cerebral arteries to vasoactive agents. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986b; 8:681-688.
- Toda N, Okamura T, Miyazaki M. Age-dependent changes in the response of isolated beagle coronary arteries to transmural electrical stimulation and catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1986a; 238: 319-326.
- Toda N, Hayashi S. Age-dependent alteration in the response of isolated rabbit basilar arteries to vasoactive agents. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 211:716-721.
- Todd PA, Heel RC. Enalapril: a review of its pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs* 1986; 31:198-248.
- Tolins JP, Palmer RMJ, Moncada S, Raji L. Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic response. *Am J Physiol* 1990; 258:H655-H662.
- Tominaga M, Fujii K, Abe I. Hypertension and ageing impair acetylcholine-induced vasodilatation in rats. *J Hypertens* 1994; 12:259-268.
- Touyz RM, Fareh J, Thibault G, Schiffrin EL. Intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28(5):797-805.
- Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: Man and rats. *Circ Res* 1981; 48:309-319.
- Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 1996; 27:32-35.
- Tsujimoto G, Lee CH, Hoffman BB. Age-related decrease in beta adrenergic receptor-mediated vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239:411-415.
- Tukunaga O, Yamada T, Fan J, Watanabe T. Age-related decline in prostacyclin synthesis by human aortic endothelial cells: qualitative and quantitative analysis. *Am J Pathol* 1991; 138:941-949.
- Urata H, Kinoshita A, Misono MS, Bumpus FM, Husain A. Identification of highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990b; 265:22348-22357.
- Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 1990a; 66:883-890.
- Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2:997-1000.
- Vander AJ. Control of renin release. *Physiol Rev* 1967; 47:359.

- Vander AJ. Effect of catecholamines and renal nerves on renin secretion in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 1965; 209:659.
- Vanhoutte PM. Aging and vascular responsiveness. *J Cardiovas Pharmacol* 1988; 12:S11-S18.
- Vane JR. Impacto de los factores de riesgo sobre el endotelio. *Cardiovascular Risk Factors* (Ed. española) 1994; 3:208-221.
- Vita JA, Treasure CB, Nabel EG. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81:491-497.
- Vokonas PS, Kannel WB, Cupples LA. Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the Framingham study. *J Hypertens* 1988; 6(suppl1):S3-S9.
- Wadsworth RM. Calcium and vascular reactivity in ageing and hypertension. *J Hypertens* 1990; 8:975-983.
- Wakabayashi I, Sakamoto K, Hatake K, Yoshimoto S, Kurahashi M. Effect of age on contractile response to angiotensin II in rat aorta. *Life Sci* 1990, 47(9):771-779.
- Waldman HM, Alter I, Kot PA, Rose JC, Ramwell PW. Effect of lung transit on systemic depressor response to arachidonic acid and protacyclin in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 204:289-293.
- Wang DH, Prewitt RL. Captopril reduces aortic and microvascular growth in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1990; 15:68-77.
- Wanstall JC, O'Donnell SR. Inhibition of norepinephrine contractions by diltiazem on aorta and pulmonary artery from young and aged rats: influence of alpha-adrenoceptor reserve. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245:1016-1020.
- Wanstall JC, O'donnell SR. Age influences responses of rat isolated aorta and pulmonary artery to the calcium channel agonist, Bay K 8664, and to potassium and calcium. *J Cardiovas Pharmacol* 198; 13:709-714.
- Wei JY. Age and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1992; 327(24):1735-1739.
- Weiss L, Lundgren Y. Left ventricular hypertrophy and its reversibility in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 1978; 12:635.
- Welch WJ, Wilcox CS. Renal haemodynamic responses to infusions of angiotensin II or phenylephrine in anaesthetized rats: Role of thromboxane. *J Physiol* 1988; 407:111P.
- Wiemer G, Schölkens BA, Becker RH, Busse R. Ramiprilat enhances endothelial autocoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension* 1991; 18:558-563.
- Wiemer G, Schölkens BA, Busse R, Wagner A, Heitsch H, Linz W: The functional role of angiotensin II subtype AT<sub>2</sub>- receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *Pharm Pharmacol Lett* 1993; 3:24-27.

Wilcox CS, Welch WJ. Angiotensin II and thromboxane in the regulation of blood pressure and renal function. *Kidney Int* 1990; 38(suppl 30):S81-S83.

Wilson KM, Magargal W, Berececk KH. Long-term Captopril treatment: angiotensin II receptors and responses. *Hypertension* 1988; 11:I148-I152.

Williams GH. Converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N Engl J Med* 1988; 319:1517-1525.

Wolinsky H. Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes: morphological and chemical studies. *Circ Res* 1972; 30:301-309.

Wolinsky H. Effects of hypertension and its reversal on the thoracic aorta of male and female rats. Morphological and chemical studies. *Circ Res* 1971; 28:622-637.

Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, Chiu AT, Ardecky RJ, Smith RD, Timmermans PBMWM. Functional studies of non peptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (AII) and PD 123177 (AII). *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255:584-592.

Wood JM, Mah SC, Schnell C. Comparison of the acute hypotensive effect of renin inhibition, converting enzyme inhibition and angiotensin antagonism in rats. *J Cardiovas Pharmacol* 1990; 16:(Suppl 4)S60-S64.

Yamaguchi Y, Feni FJ, Roman RJ, Nasjletti A. Angiotensin II influences the renal hemodynamic response to blockade of thromboxane A<sub>2</sub> and prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263:905-909.

Yamashita W, Ito Y, Weiss MA, Ooi BS, Pollak VE. A thromboxane synthetase antagonist ameliorates progressive renal disease of Dahl-S rats. *Kidney Int* 1988; 33:77-83.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.

Yokakawa K, Tahara H, Kohno H, Mandal AK, Yanagisawa M, Takeda T. Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92:2080-2085.

Ziogas J, Story DF. Effect of locally generated angiotensin II on noradrenergic neuroeffector function in the rat isolated caudal artery. *J Hypertension* 1987; 5(suppl 2):S47-S52.