

Efecto de la inhibición crónica del sistema renina-angiotensina sobre el daño cardiovascular propio de la edad en la rata normal

FELIPE INSERRA¹, LAURA V. GONZALEZ BOSCH², INES STELLA¹, NORBERTO A. TERRAGNO¹, LEON FERDER¹, NIDIA BASSO¹

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto, desde el destete, del losartán (L) o el enalapril (E) durante 6 o 18 meses en la rata normal. Se estudiaron 48 ratas macho divididas en tres grupos: C, control, E y L (10 mg/kg/día de uno u otro en el agua de bebida). La mitad se estudió a los 6 meses y el resto a los 18 meses. Se registraron la presión arterial sistólica (PAS), el peso del corazón (Cz), del ventrículo izquierdo (VI) y de la aorta (Ao). Se obtuvo una muestra de yeyuno-íleon. Cortes de corazón y de aorta se fijaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y con colorante tricrómico de Masson. Se evaluó la fibrosis cardíaca por microscopía óptica (MO) x 100. Se midió el espesor de la aorta. Las muestras de tejidos se fijaron, crioprotegieron, congelaron y cortaron. Se determinó por histoquímica, como densidad óptica (DO), la actividad NADPH diaforasa, marcador de la óxido nítrico sintasa (NOS). Se evaluó la excreción urinaria de nitratos + nitritos. Se mencionan sólo los cambios significativos ($p < 0,05$). La PAS, el peso del corazón, el ventrículo izquierdo y la aorta aumentaron con la edad. Ambos tratamientos redujeron estos aumentos. El incremento de la fibrosis cardíaca y del espesor de la Ao, con la edad, fue inhibido por el enalapril. A los 6 meses, el losartán y el enalapril aumentaron la producción de NO, que disminuyó con la edad. A los 6 y los 18 meses, la NOS aumentó en el endotelio aórtico de los animales tratados y cayó en todos los animales añosos.

Conclusión

El enalapril y el losartán previnieron la hipertrofia/hiperplasia cardiovascular y aumentaron la NOS en el endotelio aórtico, lo cual indica un efecto protector del daño cardiovascular debido a la edad ejercido a través de la inhibición de la angiotensina II. El enalapril también previno la fibrosis miocárdica y el aumento de espesor en la aorta. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 699-707.

Palabras clave Enalapril - Losartán - Aorta - Arteriolas intestinales - Oxido nítrico - Oxido nítrico sintasa - Vejez - Sistema renina-angiotensina - NADPH diaforasa

INTRODUCCION

Resultados recientes de nuestro laboratorio mostraron que el tratamiento con enalapril durante tres semanas disminuyó la presión arterial (PA) y la relación peso del ventrículo izquierdo/peso corporal en la rata adulta normal. (1) Asimismo, el tratamiento

tanto con enalapril como con losartán durante 6 meses impidió el aumento de la PA que se observa en las ratas normales y produjo una reducción de la concentración cardíaca de colágeno y de ADN y el porcentaje de fibrosis. (2) Estos cambios indicarían un efecto protector sobre el miocardio, ya que las prin-

Este trabajo fue realizado con el aporte financiero del Subsidio PIP-4606 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y obtuvo el Premio XXVII Congreso Argentino de Cardiología.

¹ Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA-CONICET

² Cátedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Trabajo recibido para su publicación: 5/00 Aceptado: 7/00

Dirección para separatas: Lic. Nidia Basso - Marcelo T. de Alvear 2270 - (1122) Buenos Aires, Argentina

cipales modificaciones de la estructura cardíaca que aparecen con la edad son la hipertrofia celular, la acumulación de colágeno y la fibrosis miocárdica. (3)

La hipertensión y el envejecimiento generan alteraciones semejantes en la función y la estructura de la pared arterial. El cambio estructural más importante es el aumento de la rigidez vascular (4) relacionado con un engrosamiento del espesor de la pared debido a hipertrofia/hiperplasia y acumulación de colágeno. (5) Por otra parte, en la aorta de la rata se ha observado disfunción del endotelio y del músculo liso vascular inducida por el envejecimiento o por la hipertensión. (6) Las similitudes entre el envejecimiento y la hipertensión sumadas al hecho de que los sujetos añosos tienen, generalmente, un aumento de la PA sugieren la posibilidad de que la hipertensión sea una forma acelerada del envejecimiento.

Comunicamos hallazgos cardiovasculares similares en ratones CF1 normales, añosos. El tratamiento con enalapril durante toda la vida produjo una reducción significativa del peso cardíaco y de la esclerosis miocárdica asociadas con el envejecimiento. Asimismo, tanto en arterias de mediano calibre coronarias, mesentéricas y renales, como en la aorta e incluso en arterias pulmonares, la relación pared/diámetro fue significativamente menor en los vasos de los animales tratados. El efecto no dependía de la presión arterial ya que no se encontró una diferencia significativa entre la presión de los tratados y la de los controles; además, el cambio se observó en los vasos pulmonares, que pertenecen a un circuito de baja presión independiente de la presión arterial sistémica. (7)

La hipertensión genética en la rata y la hipertensión esencial en el hombre se acompañan de una disminución de la relajación dependiente del endotelio. (8) Por otra parte, en el hombre, el envejecimiento reduce progresivamente la vasodilatación dependiente del endotelio en los vasos de resistencia del antebrazo. (9) También, en seres humanos, ambas condiciones deterioran la vasodilatación dependiente del endotelio, como se ha demostrado tanto en las grandes arterias de conducción como en las pequeñas arteriolas de resistencia. (10-12) En este sentido, datos experimentales han mostrado que los inhibidores de la enzima de conversión (IECA) mejoran la función endotelial. (13, 14)

La liberación de óxido nítrico (NO) es, aparentemente, menor en la hipertensión. (15) Este hecho puede deberse a menor síntesis, mayor destrucción o interacción con otros agentes derivados del endotelio que resulten en una actividad menor de ese compuesto. (8) Un trabajo reciente ha demostrado que la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva de la aorta disminuye con la edad en las ratas Wistar Kyoto (WKY) normotensas y es menor en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

que en las WKY, lo cual sugiere una interacción entre NOS, vejez e hipertensión. (16)

Numerosos estudios experimentales indican que la liberación de NO por el endotelio disminuye con la edad. (17, 18) En el hombre, la vejez también se acompaña de una vasodilatación menor dependiente del endotelio inducida por agonistas que liberan NO como la acetilcolina (ACh). La reducción de esta relajación se ha observado en vasos de conducción y de resistencia. (19-22) Esta alteración se ha detectado en sujetos añosos sanos que no presentan ningún otro factor de riesgo cardiovascular. Estudios realizados en animales viejos mostraron una disminución en las respuestas vasodilatadoras de arteriolas cerebrales a los agonistas que liberan NO. (17) En forma similar, la relajación dependiente del endotelio también cae con la edad en las arterias aorta, femoral y carótida (23, 24) y en las arteriolas de resistencia de la rata. (25) Por el contrario, la relajación arterial a un dador de NO no se altera con la edad en el hombre o en los animales de experimentación. (8) Sin embargo, y a pesar de que existen evidencias concluyentes de una declinación progresiva de la relajación dependiente del endotelio debida a la edad en individuos normales, los mecanismos responsables no se han dilucidado. En este sentido, hemos detectado un aumento de la actividad de la NOS aórtica debido a la inhibición crónica de la angiotensina II (Ang II) con enalapril o losartán en ratas adultas normales.

Teniendo en cuenta la información descripta y dado que los efectos de la edad y de la inhibición del sistema renina-angiotensina (SRA) sobre la actividad de la NOS no se han aclarado, el propósito del presente trabajo ha sido el de analizar la evolución de la PA, la hipertrofia cardiovascular, los cambios histológicos y morfométricos cardíacos y vasculares y la actividad vascular de la NOS durante el envejecimiento en ratas normales no tratadas y en animales tratados desde el destete, ya sea con enalapril o con losartán para inhibir el SRA durante toda la vida.

MATERIAL Y METODOS

Animales y diseño experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho (n = 48) divididas en tres grupos después del destete: grupo 1: control, agua *ad libitum*; grupo 2: losartán, 10 mg/kg/día en el agua de bebida; grupo 3: enalapril, 10 mg/kg/día, también en el agua de bebida (ambas drogas fueron donadas por Merck & Co., Rahway, NJ, USA). Las ratas se colocaron en grupos de cinco por jaula, en condiciones de ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y a temperatura controlada (20°-22°C). El alimento y el agua de bebida estuvieron libremente disponibles. El presente protocolo fue aprobado por

nuestro Comité Institucional sobre el Cuidado de los Animales.

Medición de la presión arterial sistólica, la ingesta de agua y de comida, el índice de crecimiento corporal y el peso del corazón y de la aorta

La presión arterial sistólica (PAS) se determinó por pletismografía de la cola, utilizando un transductor de presión conectado a un osciloscopio (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). El registro se realizó una vez al mes durante todo el periodo experimental, en todos los animales. La medición se llevó a cabo en las ratas despiertas mantenidas a una temperatura ambiente de 30°C. La ingesta de agua y el peso corporal se evaluaron dos veces a la semana para ajustar la administración de las drogas. Se estableció también la ingesta de comida. Luego de 6 meses de tratamiento, 8 animales de cada grupo fueron sacrificados bajo anestesia con pentobarbital (40 mg/kg). En forma similar, luego de 18 meses, el resto de las ratas se sacrificaron. Se extrajeron, limpiaron y pesaron el corazón y la aorta y también se aisló y disecó un segmento de yeyuno-íleon. Se registró el largo de la cola en todos los animales.

Detección de la actividad NADPH diaforasa

El corazón y la aorta se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 pH 7,4, de acuerdo con lo comunicado por Rothe y colaboradores. (26) Las muestras se crioprotegieron con sacarosa, se congelaron y cortaron en secciones de 15 µm en un crióstato. Luego se montaron sobre portaobjetos gelatinizados. Los cortes se procesaron utilizando una técnica histoquímica que permite determinar la actividad NADPH diaforasa (NADPH-d). Esta técnica se emplea como marcador histoquímico de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) isoenzima independiente, ya que se demostró que la actividad NADPH-d se inhibe por la preincubación con difeniliodonio, un inhibidor potente de la NOS. (27-29)

Luego de obtener los cortes, se incubaron durante 1 hora a 37°C con una mezcla de β-NADPH al 0,1% y de azul de nitrotetrazolio al 0,02% diluidos en buffer fosfato 0,1 M con tritón X-100 al 0,3% (Sigma, St. Louis, USA). Posteriormente, los cortes se montaron sobre portaobjetos con buffer fosfato salino/glicerol (1:3). La observación, la medición de la densidad óptica (DO) y las fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss Axiophot. Las células no se tiñeron en ausencia de β-NADPH; la sustitución de β-NADPH por β-NADH resultó en una tinción no específica de toda la muestra (datos no mostrados). En todos los casos se tuvo especial cuidado en fijar y procesar los tejidos controles y experimentales simultáneamente. La tinción de las células

las NADPH-d positivas de los distintos grupos se midió con un analizador de imágenes computarizado (Kontron-ZEISS VIDAS). Los cortes se aleatorizaron de portaobjetos previamente codificados. El promedio de DO resultó de la medición de la DO de diferentes áreas del mismo corte y de diferentes cortes del mismo tejido. Las mediciones (grupos control y experimental) las realizó un observador en forma ciega y en las mismas condiciones de luz, ganancia, balance de grises y aumento.

Estudios histológicos e histomorfométricos

Las muestras de corazón y de aorta se fijaron en formol buffer al 10% y se incluyeron en parafina. Las secciones histológicas se tiñeron con H&E y con colorante tricómico de Masson. La fibrosis cardíaca fue evaluada a ciegas por un operador entrenado mediante un puntaje semicuantitativo de acuerdo con los siguientes grados: 0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = severa, 4 = muy severa, observando 10 campos subendocárdicos y otros 10 campos subepicárdicos en microscopía óptica con una magnificación x 100. El espesor de la aorta se evaluó en cortes de aorta realizados al mismo nivel y se midió a ciegas. Esta medición la realizó un observador entrenado utilizando un ocular graduado a x 400, en dos sectores exactamente opuestos, perpendiculares al diámetro mayor del corte en cada vaso. Se promediaron las dos mediciones en cada corte y se expresaron en micrones (µ).

Excreción urinaria de nitratos + nitritos

Una semana antes del sacrificio se colocaron todos los animales en jaulas metabólicas durante 24 horas para recolectar orina. La concentración de los metabolitos del NO (nitratos + nitritos) se midió en las muestras de orina de acuerdo con el método descrito por Verdon y colaboradores. (30) Los resultados se expresan en µmol/mg de creatinina.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± ESM. Las diferencias se examinaron por análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Efecto de la inhibición crónica del SRA sobre el aumento de peso corporal, el consumo de agua y comida, la tasa de crecimiento corporal y la presión arterial sistólica

Las diferencias entre los animales tratados y los controles fueron similares a los 6 y a los 18 meses de

Tabla 1
Peso corporal, presión arterial sistólica, consumo de agua y peso de corazón, ventrículo izquierdo y aorta en ratas normales de 6 y 18 meses

	C6	E6	L6	C18	E18	L18
PC (g)	673 ± 15	542 ± 14*	692 ± 22	759 ± 27	621 ± 26*	823 ± 50
PAS (mm Hg)	125 ± 2	104 ± 3*	108 ± 3*	131 ± 5	105 ± 3*	110 ± 4*
CA [†]	10,8 ± 0,2	14,2 ± 0,2	8,6 ± 0,3*	9,5 ± 0,3	12,2 ± 0,2*	8,6 ± 0,3
PCz (g)	1,53 ± 0,05	1,25 ± 0,04*	1,50 ± 0,06	1,82 ± 0,07	1,54 ± 0,04*	1,60 ± 0,05*
PVI (g)	1,25 ± 0,07	0,96 ± 0,05*	1,18 ± 0,05	1,34 ± 0,07	1,10 ± 0,05*	1,18 ± 0,04*
PAo (mg)	172 ± 6	163 ± 5	168 ± 10	288 ± 16	171 ± 5*	215 ± 30*
Espesor Ao (μ)	36,2 ± 1,0	34,1 ± 1,9	34,9 ± 1,2	60,5 ± 7,0	47,9 ± 2,4*	54,4 ± 3,9
Fibrosis Cz %	0,81 ± 0,09	0,50 ± 0,10	0,79 ± 0,08	1,75 ± 0,23	0,50 ± 0,19	1,69 ± 0,21

PC: Peso corporal. PAS: Presión arterial sistólica. CA: Consumo de agua. PCz: Peso de corazón. PVI: Peso de ventrículo izquierdo. PAo: Peso de aorta. C: Control. E: Enalapril. L: Losartán. 6, 18: Tiempo en meses. [†]: En ml/100 g PC/día. * p < 0,05 respecto de C.

tratamiento en lo que se refiere al aumento del peso corporal (PC), el consumo de agua (CA) y de comida (CC), la presión arterial sistólica (PAS) y la tasa de crecimiento corporal (TCC) medida por la longitud de la cola. Los resultados a los 18 meses de estudio revelaron que ambos tratamientos impidieron el aumento de la PAS dependiente de la edad. El aumento de PC fue menor en los animales tratados con enalapril, mientras que el losartán no tuvo ningún efecto; el CC (g/100 g de PC/día) fue igual en los tres grupos: control 7,10 ± 0,2, losartán 6,7 ± 0,2, enalapril 7,2 ± 0,2. La longitud de la cola (cm), usada como marcador de la tasa de crecimiento corporal, fue similar en los tres grupos: control 20,50 ± 0,25, losartán 20,80 ± 0,12, enalapril 20,60 ± 0,29. Basados sobre este hecho, el peso de los órganos no se normalizó por el peso corporal.

El CA (ml/100 g de PC/día) fue aumentado significativamente por el enalapril y levemente reducido por el losartán. Los resultados obtenidos a los 6 y 18 meses se presentan respectivamente en la Tabla 1.

Cambios cardiovasculares inducidos por el tratamiento con ambas drogas

El enalapril indujo una disminución del peso del corazón y del ventrículo izquierdo en los animales de 6 meses. Asimismo, redujo el porcentaje de fibrosis cardíaca en ese período. A los 18 meses, ambos tratamientos impidieron el aumento del peso del

corazón, el ventrículo izquierdo y la aorta; el enalapril también disminuyó el espesor de la aorta y la fibrosis miocárdica. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

La actividad de la NADPH diaforasa luego del tratamiento crónico con losartán o enalapril

La actividad de la NOS evaluada como NADPH diaforasa aumentó sólo en la aorta y en las arteriolas intestinales de las ratas tratadas cuando se compararon con los controles. En la Figura 1 se muestran microfotografías representativas de las células de la aorta marcadas positivamente pertenecientes a los animales controles y tratados con losartán o enalapril durante 6 meses. En la Figura 2 aparecen los resultados correspondientes a 18 meses. La valoración de la densidad óptica (DO) en el músculo liso y en el endotelio aórtico se expone en la Tabla 2, mientras que los datos correspondientes al músculo liso de las arteriolas intestinales se describen en la Tabla 3. Se observó un aumento de la actividad de la NADPH-d en el endotelio de la aorta a los 6 meses de tratamiento con ambas drogas. El losartán también incrementó la actividad de la enzima en el músculo liso de la aorta y el enalapril en la pared de las arteriolas. Luego de 18 meses de tratamiento, ambos agentes indujeron una mayor actividad enzimática sólo en el endotelio aórtico. El enalapril redujo la NADPH-d en el músculo liso arteriolar.

Tabla 2
NADPH diaforasa expresada como densidad óptica en la aorta

	Endotelio		Músculo liso	
	6 meses	18 meses	6 meses	18 meses
Control	0,089 ± 0,002	0,042 ± 0,009 [†]	0,123 ± 0,003	0,069 ± 0,003 [†]
Losartán	0,150 ± 0,007*	0,081 ± 0,007**	0,162 ± 0,012*	0,063 ± 0,004 [†]
Enalapril	0,126 ± 0,005*	0,095 ± 0,011*	0,111 ± 0,007	0,064 ± 0,006 [†]

* p < 0,05 respecto de control. [†] p < 0,05 respecto de 6 meses (ANOVA). n = 15 para cada grupo.

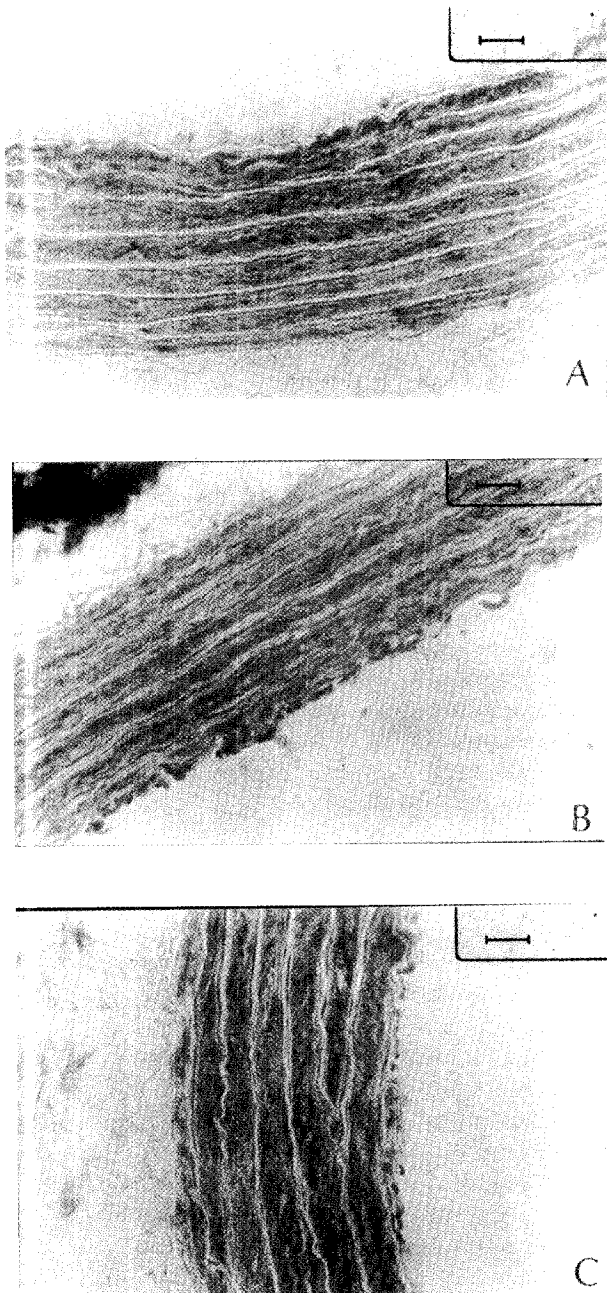


Fig. 1. Microfotografías representativas de las células de la aorta marcadas positivamente para NADPH diaforasa, pertenecientes a los animales controles (A) y tratados con enalapril (B) o losartán (C) durante seis meses. Se destaca la intensidad de la marcación en el endotelio y en el músculo liso de los tejidos de animales tratados en comparación con los controles. Barra de escala: 24 μ m.

Efecto de la inhibición crónica con losartán o enalapril sobre la excreción urinaria de nitratos + nitritos

La excreción urinaria de nitratos + nitritos se utilizó como marcador de la producción de NO, dado que se expresó con respecto a la excreción urinaria de creatinina. Ambos tratamientos elevaron la ex-

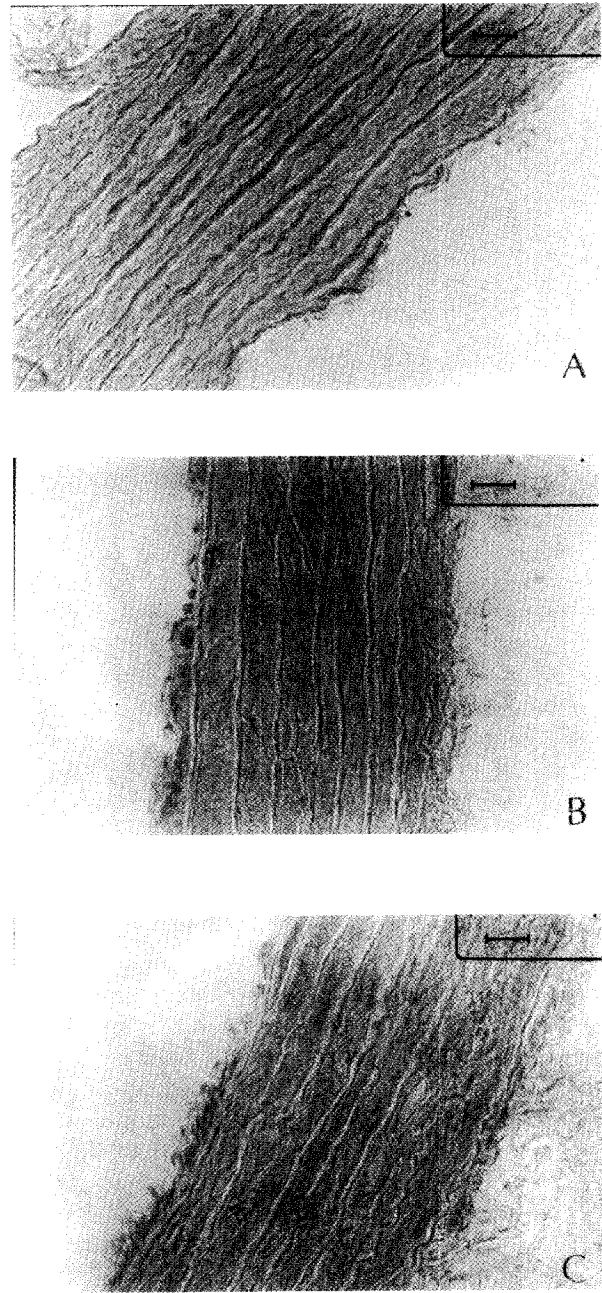


Fig. 2. Microfotografías representativas de las células de la aorta marcadas positivamente para NADPH diaforasa, pertenecientes a los animales controles (A) y tratados con enalapril (B) o losartán (C) durante dieciocho meses. Se destaca la intensidad de la marcación en el endotelio y en el músculo liso de los tejidos de animales tratados en comparación con los controles. Barra de escala: 24 μ m.

creción urinaria de los productos derivados del NO luego de 6 meses de tratamiento. A los 18 meses todos los animales presentaron una excreción urinaria menor de nitratos + nitritos cuando se comparó con los resultados de 6 meses de tratamiento. Los datos correspondientes se detallan en la Tabla 4.

Tabla 3
NADPH diaforasa expresada como densidad óptica
en arteriolas intestinales

	Músculo arteriolar	
	6 meses	18 meses
Control	0,124 ± 0,009	0,114 ± 0,004
Losartán	0,125 ± 0,004	0,114 ± 0,005
Enalapril	0,145 ± 0,006*	0,094 ± 0,005*†

* p < 0,05 respecto de control. † p < 0,05 respecto de 6 meses (ANOVA). n = 15 para cada grupo.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo revelan que la inhibición crónica del SRA evitó el aumento de la PA propio de la edad observado en los animales normales no tratados. Ambos agentes son antihipertensivos eficaces en algunas formas de hipertensión humana y experimental que no presentan niveles elevados de renina circulante. (31) La información disponible en la rata normal es más escasa. Se confirman estudios realizados en animales normotensos tratados crónicamente con IECA o bloqueadores del receptor AT1; (32, 33) el papel del SRA en la regulación y el mantenimiento de la PA normal sería más importante que lo aceptado previamente. (33)

El envejecimiento va acompañado por una reducción de la distensibilidad aórtica que está asociada con la hipertrofia ventricular izquierda (HVI). El cambio mencionado en los animales añosos se comprobó por el incremento de la masa vascular aórtica. Los animales normales seniles desarrollan HVI debido a la mayor resistencia vascular que participa primariamente en el aumento de la poscarga. No obstante, una serie de factores neurohumorales aumentan la síntesis proteica, la formación de la matriz extracelular y el tamaño de las miofibrillas. El más potente de estos factores tróficos es la Ang II, que promueve la hipertrofia de los miocitos, el incremento de la matriz extracelular y el desarrollo de fibrosis miocárdica, en forma independiente de su acción sobre la PA. Por consiguiente, los agentes que bloquean el SRA inducirían más eficientemente la regresión de la HVI. Nuestros resultados muestran que ambas drogas fueron igualmente activas en la prevención de la HVI y de la hiperplasia aórtica, que sugiere una acción protectora cardiovascular en la rata normal añosa y confirma datos previos en ratón CF1 envejecido. (7) Los IECA reducen significativamente la fibrosis cardíaca que se desarrolla precozmente a los 6 meses y se hace muy significativa a los 18 meses. Contrariamente, el losartán, en la dosis utilizada, no evitó la aparición de la fibrosis miocárdica debida a la edad. Sin embargo, en resultados muy recientes utilizando una dosis mayor de

Tabla 4
Excreción urinaria de nitratos + nitritos

	Nitratos + nitritos µmoles/mg creatinina	
	6 meses	18 meses
Control	0,037 ± 0,008	0,016 ± 0,004†
Losartán	0,322 ± 0,106*	0,009 ± 0,003†
Enalapril	0,252 ± 0,107*	0,022 ± 0,005†

Los valores representan la media ± ESM. Los datos se analizaron por medidas repetidas de la prueba de ANOVA, después de ser transformados a logaritmos, dado que las variancias fueron significativamente diferentes (p < 0,05 por prueba de Bartlett). * p < 0,01 versus control. † p < 0,05 versus 6 meses. n = 10.

losartán (30 mg/kg/día) se observó una protección similar a la del enalapril. La angiotensina II tendría un papel central en el desarrollo de la fibrosis miocárdica.

Asimismo, se observó una disminución del espesor de la pared de la aorta en los animales tratados con enalapril, que corrobora resultados previos. (7) En los animales que recibieron losartán se detectó una tendencia en igual sentido que no alcanzó significación, lo cual sugiere el uso de una dosis insuficiente de este compuesto. La hipertrofia/hiperplasia vascular del envejecimiento también podría estar vinculada a la Ang II.

Existen datos experimentales acerca de la recuperación de la función endotelial en la rata hipertensa por el tratamiento con IECA. Los efectos farmacológicos de estos agentes están vinculados con más de un mecanismo, básicamente, la inhibición de la formación de Ang II y el bloqueo del metabolismo de la bradiquinina; por lo tanto, consideramos necesario constatar que su acción fuera básicamente debida al bloqueo del SRA, ya sea en el plasma o en los tejidos. La comparación con un bloqueante AT1 que específicamente impide la unión del polipéptido a su receptor ha contribuido a dilucidar este problema.

El papel del NO en la homeostasis de la PA está avalado por evidencia experimental sólida. (34) El NO también previene la activación y la adhesión de los neutrófilos y las plaquetas al endotelio vascular. (35) Algunos resultados indican que el NO es un inhibidor endógeno del crecimiento del músculo liso vascular (36, 37) y puede modular el remodelado vascular secundario a una lesión. El NO produce vasodilatación por activación de la guanilato ciclasa soluble del músculo liso con aumento de la formación de GMP cíclico. En este sentido, encontramos mayor concentración de dicho componente en las aortas de ratas tratadas con losartán durante 6 meses. (2) Nuestros resultados muestran que la inhibición del SRA potencia efectivamente la actividad de

la NOS en las células endoteliales de las arterias elásticas y mantiene el nivel de este componente en los animales añosos. La activación de la NOS se ha confirmado por el incremento en la excreción urinaria de nitratos + nitritos en todos los animales tratados, índice de una mayor producción de NO. Asimismo, la excreción urinaria de estos compuestos fue significativamente menor en los animales añosos, hecho que corrobora la caída de la actividad enzimática con la edad.

El enalapril actúa sobre la NOS del músculo liso vascular en las arteriolas de resistencia y la acción del losartán se evidencia en las células del músculo liso vascular de las grandes arterias. El efecto del enalapril podría estar vinculado al aumento de la bradiquinina, ya que este compuesto es un estimulante potente de la liberación de NO tanto en las arterias como en las venas. (38) Sin embargo, ambos agentes muestran un efecto similar en las células endoteliales, señalando una acción básicamente vinculada al bloqueo del SRA que, sobre la base de estudios clínicos, sería independiente de la PAS menor. En este sentido, en pacientes hipertensos tratados por 6 meses con temocapril se registró un aumento de la hiperemia reactiva en el antebrazo, mientras que la amlodipina, con igual efecto hipotensor, no produjo un incremento similar. (39) Asimismo, el estudio TREND sugiere que los IECA corregirían la disfunción endotelial independientemente de su acción antihipertensiva. (40)

Los datos que aporta el presente estudio comprueban que la actividad de la NOS en la aorta disminuye con la edad, como se ha descrito para las ratas WKY. (14)

Este hallazgo es compatible con la reducción, debida a la edad y a la hipertensión, de la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina (ACh), ya que involucra una formación menor de NO. (6) La administración crónica de inhibidores del SRA en ratas añosas mantiene la actividad de la NOS endotelial en el nivel detectado en los animales jóvenes, lo cual señala un efecto protector de la función vascular y corrobora que la administración prolongada de IECA en las SHR mejora la relajación endotelial a la ACh. (41) Estos datos ratifican el efecto de la inhibición del SRA sobre la actividad de la NOS. No obstante, la importancia de este tema en la fisiopatología de la vejez y de la hipertensión necesita y merece una mayor y más completa investigación.

CONCLUSION

Podemos concluir que los resultados presentados muestran varios efectos del enalapril y del losartán en la rata añosa normal. Ambos agentes redujeron la PA, el peso del corazón, del ventrículo izquierdo y de la aorta, sugiriendo que estos cambios eran

mediados por el bloqueo del SRA. En forma similar, la mayor actividad de la NOS vascular corroborada por la mayor excreción urinaria de nitratos + nitritos sería a consecuencia de la inhibición del SRA. Por otra parte, sólo el enalapril produjo una reducción significativa de la fibrosis cardíaca y del espesor de la aorta. En términos generales, el bloqueo prolongado de la Ang II ejercería un efecto protector sobre el daño cardiovascular propio del envejecimiento.

SUMMARY

EFFECT OF CHRONIC INHIBITION OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM ON CARDIOVASCULAR DAMAGE DUE TO AGING IN NORMAL RATS

The present study was performed to assess the effects of either enalapril (E) or losartan (L) given since weaning to normal rats during 6 or 18 months. Animals (n = 48) were divided in three groups: control, E treated and L treated. Treated rats received 10 mg/kg/day of the selected drug. Half of the rats were studied at 6 months and the rest at 18 months of life. Systolic blood pressure (SBP), body weight (BW), water intake (WI) and food intake (FI) were assessed as, as well as cardiac, left ventricular and aortic weights. A segment of the jejunum-ileum was also isolated. Cardiac fibrosis was evaluated by light microscopy at 100X. The thickness of the aortic wall was measured. NADPH-diaphorase activity was determined as a marker of nitric oxide synthase (NOS) activity in aorta, arterioles of small intestine, heart and kidney of normal rats. NOS activity was measured through the optical density (OD) of the stained tissue. Urinary excretion of nitrates + nitrites was determined. Only significant differences ($p < 0.05$) are reported. SBP, absolute cardiac, left ventricular and aortic weights increased with age. Renin angiotensin system inhibition delayed these increases. The increase in cardiac fibrosis and aortic thickness, due to aging, was prevented by E. At 6 months L and E enhanced the NO release, which was lower with aging. At 6 and 18 months, NOS activity was increased in the aortic endothelium of all treated animals and was lower in aged rats.

Conclusions

Both E and L prevented cardiovascular hypertrophy/hyperplasia and increased NOS activity in the aortic endothelium indicating an action exerted through inhibition of the renin-angiotensin system and pointing out to a protective effect on cardio-

vascular damage due to aging. E also inhibited myocardial fibrosis and thickening of the aortic wall.

Key words Enalapril - Losartan - Aorta - Intestinal arterioles - Nitric oxide synthase - NADPH-diaphorase - Renin-angiotensin system - Aging

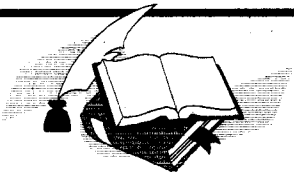
Agradecimientos

Por el apoyo financiero recibido a través del Subsidio PIP-4606 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de la República Argentina. Las drogas utilizadas en los tratamientos, enalapril y losartán, fueron gentilmente provistas por el laboratorio Merck & Co., Rahway, NJ, USA.

BIBLIOGRAFIA

- Mazzadi A, Gómez Llambí H, Basso N. Effect of enalapril treatment on the heart of normal rats. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 867-884.
- González Bosc LV, Kurnjec ML, Müller A y col. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the cardiovascular system of the normal rat. *Am J Hypertens* 2000; (in press).
- Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH y col. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 1990; 67: 871-885.
- Gaballa MA, Jacob CT, Raya TE y col. Large artery remodeling during aging. Biaxial passive and active stiffness. *Hypertension* 1998; 32: 437-443.
- Michel JB, Azizi M, Salzmann JL y col. Effect of vasodilators on the structure of the aorta in normotensive ageing rats. *J Hypertens* 1987; 5: S165-S168.
- Küng CF, Lüscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 1995; 25: 194-200.
- Inserra F, Romano L, Ercole L y col. Cardiovascular changes by long-term inhibition of the renin-angiotensin system in aging. *Hypertension* 1995; 25: 437-442.
- Panza JA. Nitric oxide in hypertension. *En: Oparil S, Weber MA (eds). Hypertension: A companion to Brenner and Rector's the Kidney. Philadelphia: Saunders WB Company 2000; pp 158-165.*
- Gerhard M, Roddy MA, Creager SJ y col. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels in humans. *Hypertension* 1996; 27: 849-853.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr y col. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-27.
- Linder L, Kiowski W, Buhler FR y col. 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.
- Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL y col. Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ Res* 1992; 71: 776-781.
- Novosel D, Lang MG, Noll G y col. Endothelial dysfunction in aorta of the spontaneously hypertensive, stroke-prone rat: Effects of therapy with verapamil and trandolapril alone and in combination. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 979-985.
- Young RH, Ding YA, Lee YM y col. Cilazapril reverses endothelium-dependent vasodilator response to acetylcholine in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1995; 8: 928-933.
- Hayakawa H, Hirata Y, Suzuki E y col. Mechanisms of altered endothelium-dependent vasorelaxation in isolated kidneys from experimental hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993; 264: H1535-H1541.
- Chou TC, Yen MH, Li CY y col. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998; 31: 643-648.
- Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL y col. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol* 1990; 258: H138-H143.
- Lüscher TF, Tanner FC, Dohi Y. Age, hypertension and hypercholesterolemia after endothelium-dependent vascular regulation. *Pharmacol Toxicol* 1992; 70: S32-S39.
- Vita JA, Treasure CB, Nabel EG y col. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81: 491-497.
- Zeher AM, Drexler H, Saurbier B y col. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 652-662.
- Egashira K, Inou T, Hirooka Y y col. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 1993; 88: 77-81.
- Celermajer DS, Sorenson KE, Spiegelhalter DJ y col. 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.
- Hongo K, Nakagomi T, Kasell NF y col. Effect of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke* 1988; 19: 892-897.
- Moritoki H, Hosoki E, Ishida Y. Age related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 1986; 126: 61-67.
- Soltis EE. Effect of age, blood pressure and membrane dependent vascular responses in the rat. *Circ Res* 1987; 61: 889-897.
- Rothe F, Canzler U, Wolf G. Subcellular localization of the neuronal isoform of nitric oxide synthase in the rat brain: A critical evaluation. *Neuroscience* 1998; 83: 259-269.
- Vincent S, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 46: 755-784.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS y col. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: A FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7773-7777.
- Stuehr DJ, Fasehum OA, Kwon NS y col. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenylene-iodonium and its analogs. *FASEB J* 1991; 5: 98-103.
- Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Analytical Biochemistry* 1995; 224: 502-508.
- Lundie MJ, Friberg P, Kline RL y col. Long-term inhibition of the renin-angiotensin system in genetic hypertension: Analysis of the impact on blood pressure and cardiovascular structural changes. *J Hypertens* 1997; 15: 339-348.
- Michel JB, Heudes D, Michel O y col. Effect of chronic ANG-I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol* 1994; 267: R124-R135.
- Collister JP, Hornfeldt BJ, Osborn JW. Hypertensive response to losartan in normal rats. Role of Ang II and the area postrema. *Hypertension* 1996; 27: 598-606.
- Moncada S, Higgins ES. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Ann Rev Med* 1997; 48: 489-509.
- Peiro C, Redondo J, Rodríguez-Martínez MA y col. Influence of endothelium on cultured smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 1995; 25: 748-751.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit

- nitrogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-1777.
38. Yang Z, Arnet U, Von Segesser L y col. Different effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in human arteries and veins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: S17-S22.
39. Iwatsubo H, Nagano M, Sakai T y col. Converting enzyme inhibitor improves forearm reactive hyperemia in essential hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 286-290.
40. Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C y col. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease: The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) study. *Circulation* 1996; 94: 258-265.
41. Bennett MA, Hillier C, Thurston H. Endothelium-dependent relaxation of resistance arteries from spontaneously hypertensive rats: Effects of long-term treatment with perindopril, quinapril, hydralazine or amlodipine. *J Hypertens* 1996; 14: 389-397.



MEDICAL BOOKS

Desde hace quince años trabajamos en la comercialización de bibliografía médica. Asesoramos a nuestros Clientes en forma personalizada.

** Profesionales de la Salud*

** Bibliotecas Biomédicas*

** Industria Farmacéutica*

** Actividades Académicas*

** Departamentos de Docencia*

***** Editoriales Nacionales y Extranjeras - Suscripciones *****

*Gascón 657 16° "D"
(1181) Capital Federal*

*Tel.: 4861-7857 / Fax : 4867-0691
E-Mail : medbooks@dynamo.com.ar*