

Efectos del losartán sobre el glomus carotídeo en ratas normotensas adultas

DANIEL R. GRANA¹, GABRIEL CAO², NORA PAGLIA¹, JORGE E. TOBLLI^{1,2}, JOSÉ MILEI^{MTSAC, 1}

Recibido: 03/05/2006

Aceptado: 14/07/2006

Dirección para separatas:

Prof. Dr. José Milei

Instituto de Investigaciones
Cardiológicas

"Prof. Dr. Alberto C. Taquini"

(ININCA) UBA-CONICET

Marcelo T. de Alvear 2270

(C1122AAJ) Ciudad Autónoma

de Buenos Aires

Tel./Fax: 54 11 4508-3888

e-mail: ininca@fmed.uba.ar

RESUMEN

Recientemente comunicamos lesiones graves en el glomus carotídeo y los ganglios autonómicos de ratas SHR y sugerimos que este efecto se debía más al aumento de la presión arterial que al envejecimiento. Posteriormente demostramos, en SHR, que el ramipril, en comparación con el atenolol, ejerce un efecto protector sobre estas estructuras más allá de la reducción de la presión arterial. Teniendo en cuenta que no existen trabajos que describan los cambios que origina el bloqueo AT1 sobre la morfología del glomus en ratas normotensas, se realizó el presente estudio con el objetivo de evaluar el efecto del losartán sobre esta estructura de ratas Wistar macho tratadas durante 8 meses.

Se emplearon 14 ratas de 4 semanas de edad, divididas en grupos control y losartán (10 mg/kg/día en el agua de bebida). La presión sistólica (PAS) se registró al inicio y luego mensualmente. A la edad de 9 meses se sacrificaron las ratas y se extrajeron los glomus carotídeos, se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson y se procesaron para histomorfometría con un analizador de imágenes.

El grupo control registró una PAS de $115 \pm 8,1$, mientras que en el grupo losartán fue de $105 \pm 8,3$ mm Hg ($p = 0,0375$). Histomorfométricamente, el grupo tratado mostró un área mayor del glomus con respecto al control (497.931 ± 48.783 versus $59.668 \pm 6.196 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$) y una relación pared/luz en las arteriolas glómicas de $0,7 \pm 0,1$ versus $2,7 \pm 0,6$, respectivamente ($p < 0,0001$).

El grupo control mostró disminución del área glómica y un aumento de la relación pared/luz, lo cual sugiere que la atrofia de las estructuras estudiadas a través del aumento de la edad se vincula con el aporte nutricional arterial.

REV ARGENT CARDIOL 2006;74:384-388.

Palabras clave > Glomus carotídeo - Losartán - Hipertensión - Anatomía patológica

Abreviaturas >

ECA	Enzima convertidora de la angiotensina	SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
PAS	Presión arterial sistólica	SRA	Sistema renina-angiotensina

INTRODUCCIÓN

El interés por la fisiología, la patología y la clínica de la baroquimiorrección se ha visto afectado por la escasa información sobre la morfología de estas estructuras en la enfermedad. (1)

El glomus o cuerpo carotídeo se encuentra ubicado en las horquillas carotídeas, compuesto por lóbulos compactos separados por tejido conectivo. (2) Estos lóbulos o ácinos consisten en células principales (células epiteliales o tipo I) organizadas en nidos compactos y células tipo II (de sostén), localizadas en la periferia de los nidos de células principales. Rodeando los lóbulos se encuentran nervios aferentes y nervios simpáticos posganglionares, así como neuronas autonómicas distribuidas en forma compleja. (2)

Los baroquimiorreflejos carotídeos tienen un papel importante en los ajustes dinámicos de la circulación y la ventilación a lo largo de la vida diaria. (3)

Recientemente describimos en pacientes añosos, fallecidos de accidente cerebrovascular con grave ateromatosis carotídea concurrente, una fibrosis grave del glomus carotídeo acompañada por un gran estrechamiento de las arteriolas que lo irrigan. (1) Tanto la fibrosis como la reducción en la vascularización glómicas no pudieron explicarse solamente por un "fenómeno de envejecimiento", pero la superposición de hipertensión y/o diabetes, aterosclerosis y envejecimiento fue un factor limitante para interpretar los hallazgos descriptos.

Por ello, a continuación estudiamos morfológicamente el glomus carotídeo de ratas espontáneamente

Trabajo seleccionado para optar al Premio Eduardo Braun Menéndez de Investigación Básica en Hipertensión Arterial del XXXII Congreso Argentino de Cardiología

MTSAC Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. Alberto C. Taquini". Facultad de Medicina UBA - CONICET

² Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán, Buenos Aires Argentina

hipertensas (SHR), un modelo de estrés hemodinámico, sin otras patologías concurrentes. (4) Observamos una alta correlación entre la presión arterial y el desarrollo de lesiones tanto en el glomus carotídeo como en los ganglios autonómicos. Al comparar con sus controles normotensos, las ratas WKY, encontramos una expansión en la matriz extracelular y una disminución en el número de neuronas en estas estructuras. La expresión del factor de transformación- β_1 (TGF- β_1), así como la del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) estaban aumentadas en la matriz extracelular. (4) Además, las SHR tuvieron una relación pared/lumen mayor en los pequeños vasos periglómicos con un gran número de células S100+ en el glomus carotídeo. (4) En síntesis, en ese trabajo sugerimos que tanto el glomus carotídeo como los ganglios autonómicos de las SHR son órganos blanco de la hipertensión, es decir, las lesiones encontradas se deberían más al aumento de la presión arterial que al envejecimiento. (4)

Recientemente estudiamos si las lesiones halladas previamente en SHR podían prevenirse en diferente grado con el uso de un betabloqueante o de un inhibidor de la ECA. Así, encontramos que el ramipril ejerce un efecto protector sobre estas estructuras que va más allá de la reducción de la presión arterial al compararlo con el atenolol (observaciones no publicadas).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos del bloqueo AT1 con losartán sobre el glomus carotídeo de ratas Wistar macho luego de 8 meses de tratamiento, habida cuenta de que no existen trabajos que describan los cambios que origina dicha droga sobre la morfología de esa estructura en ratas normotensas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todas las experiencias cumplieron con las recomendaciones internacionales de la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (EE.UU.). Se utilizaron 14 ratas Wistar macho de 4 semanas de edad, divididas en: grupo control ($n = 7$) y grupo losartán ($n = 7$), que recibió 10 mg/kg/día en el agua de bebida.

Los animales se mantuvieron en condiciones estándares de laboratorio a 21 ± 2 °C y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad (7 am-7 pm). Las ratas tuvieron acceso a agua potable y balanceado comercial (16-18% proteína, Cargill-Argentina) *ad libitum* a lo largo del estudio. A fin de ajustar la dosis, se registraron el peso y el consumo de líquido de cada animal.

La presión arterial sistólica (PAS) se registró al inicio del estudio y luego mensualmente (Tabla 1). Después de ocho meses de tratamiento, las ratas se sacrificaron con pentobarbital intraperitoneal (40 mg/kg). Se extrajeron los glomus carotídeos y se procesaron para microscopía óptica. Los especímenes se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, para luego ser procesados con un analizador de imágenes para efectuar histomorfometría.

Medición de la presión arterial sistólica

La PAS se registró al inicio del estudio y luego mensualmente por el método pletismográfico de la cola. Se introdu-

Tabla 1. Consumo de agua de bebida por cada 100 gramos de peso corporal

Mes	Grupo losartán (ml/100 g/día)	Grupo control (ml/100 g/día)
1	17,3 \pm 1,1	18,5 \pm 0,8
2	14,3 \pm 0,6	15,2 \pm 0,8
3	11,4 \pm 0,7	12,5 \pm 0,5
4	11,0 \pm 0,5	11,0 \pm 0,4
5	9,7 \pm 0,6	10,7 \pm 0,3
6	8,0 \pm 0,7	9,0 \pm 0,4
7	8,8 \pm 0,2	9,3 \pm 0,3
8	7,8 \pm 0,4	8,8 \pm 0,3
9	7,9 \pm 0,3	8,5 \pm 0,2

geron las ratas en una cámara sin anestesia y se les colocó un transductor neumático de pulso en la superficie ventral de la cola distal al manguito, a fin de detectar el retorno de la onda de pulso luego del lento desinflado del manguito. La presión se determinó con un electroesfigmomanómetro programado PE-300 (Narco Bio-Systems, Austin, Texas) y los pulsos se registraron en un Physiograph MK-IIIS (Narco Bio-Systems, Austin, Texas). Se efectuaron tres determinaciones de la presión en cada sesión y la PAS fue el promedio de ellas.

Procesamiento histológico

Luego de incidir la línea media, se extrajo en bloque la zona de la bifurcación carotídea bilateralmente. Se fijó en formol tamponado al 10% (pH 7,2). Posteriormente, los especímenes se incluyeron en parafina y los cortes seriados de 3 μ m se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Histomorfometría

Los cortes se estudiaron con un analizador de imágenes Image-Pro Plus versión 3 para Windows (Media Cybernetics, LP Silver Spring, MD, USA) con una magnificación de \times 400 y con la modalidad a ciegas. Se evaluaron: el área del glomus (μ m²), el espesor de la pared arteriolar (μ m), la luz arteriolar (μ m) y la relación pared/luz arteriolar.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como media \pm desvío estándar. Se efectuó la prueba de la *t* de Student con el *software* estadístico GraphPad InStat versión 3.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Como era de esperar, al final del estudio las ratas tratadas con losartán tenían una PAS de $105 \pm 8,3$ mm Hg, significativamente menor que las controles ($115 \pm 8,1$ mm Hg; $p = 0,0375$).

El glomus carotídeo se encontró en la zona de la horquilla o bifurcación carotídea, formado por lóbulos compactos separados por tejido conectivo atravesado por numerosas fibras nerviosas y pequeños vasos sanguíneos (Figura 1). El parénquima estaba for-

mado por dos tipos celulares: las células principales o tipo I, de núcleos grandes y redondeados, y las células de sostén o tipo II, elongadas y situadas periféricamente respecto de las primeras (Figura 2). Los lóbulos conforman las unidades funcionales de la estruc-

tura que estaban mejor conservados en el grupo tratado con losartán (Figura 3, A). Asimismo, la estroma fibrosa era mucho más evidente en el grupo control, donde el intersticio estaba aumentado con reemplazo de células y disminución de su número (Figura 4, A).

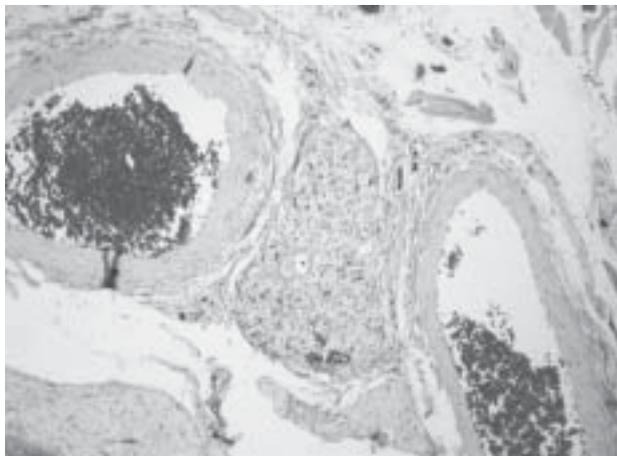


Fig. 1. Corte transversal de las carótidas interna (*a la izquierda*) y externa (*a la derecha*). En la parte media se observa el glomus carotideo, estructura altamente vascularizada, de forma triangular. Debajo del glomus se observan filetes nerviosos. Tricrómico de Masson x10.

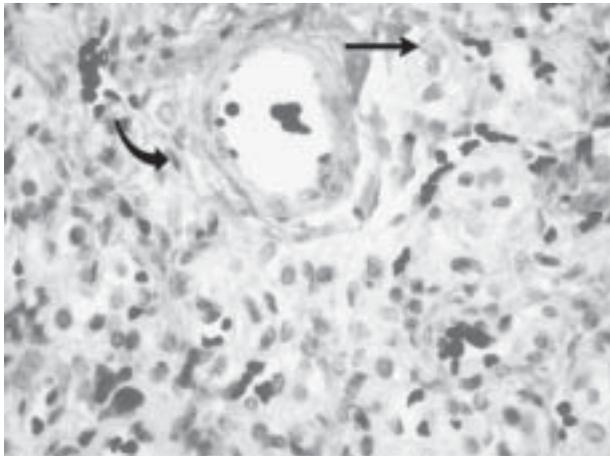


Fig. 2. Detalle a mayor aumento de la Figura 1 donde se observa la estructura lobular típica del glomus carotideo con numerosas células principales, de núcleo redondeado (*flecha recta*), y células sustentaculares de núcleo alargado, menos numerosas (*flecha curva*). Tricrómico de Masson x100.

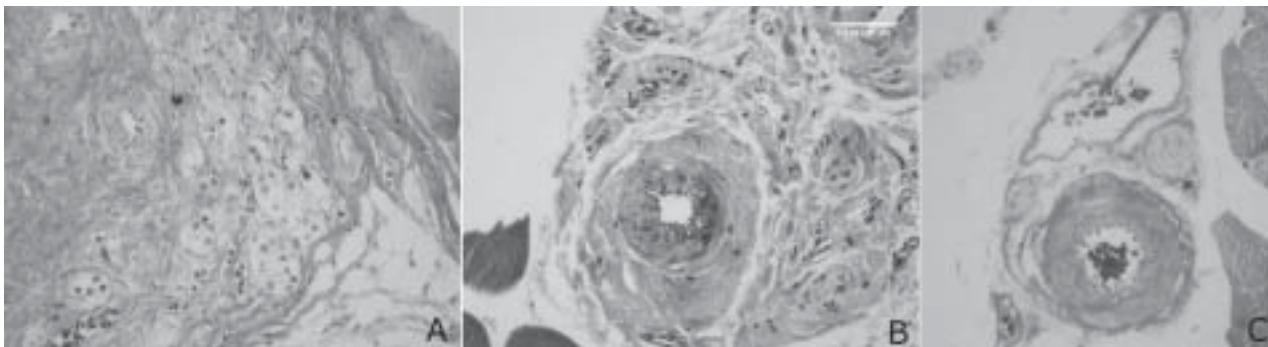


Fig. 3. Grupo control. **A.** Se observa la estructura glómic con marcada fibrosis, especialmente a la izquierda de la microfotografía con reemplazo de células acinares y franca disminución de su número. Tricrómico de Masson x40. **B y C.** Arterioles periglómicas con marcado engrosamiento de la media y fibrosis que reducen la luz vascular. Tricrómico de Masson x100.

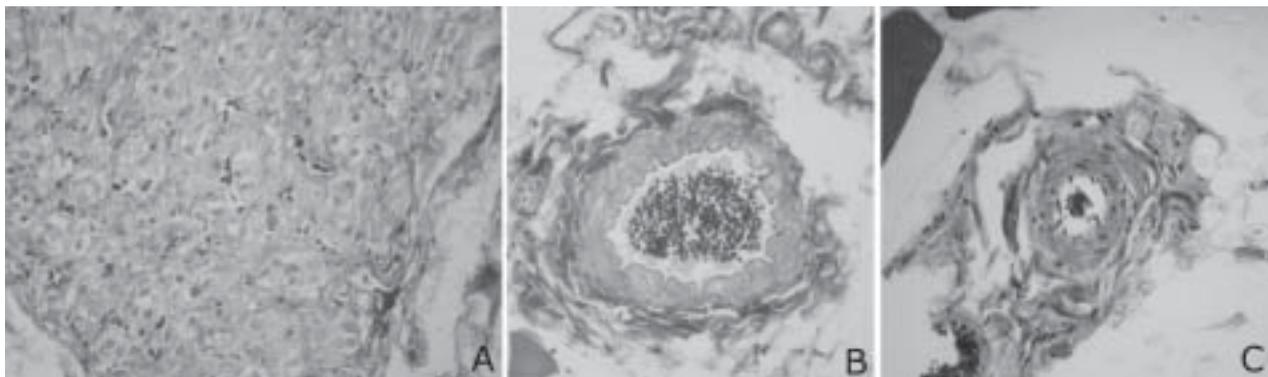


Fig. 4. Grupo losartán. **A.** Se observa la estructura glómic conservada, con discreto aumento del intersticio y relativa preservación del número de células. Tricrómico de Masson x40. **B y C.** Arterioles periglómicas con luz conservada y leve engrosamiento de la media. Tricrómico de Masson x100.

El análisis histomorfométrico se detalla en la Tabla 2 con las significaciones estadísticas encontradas.

Claramente, las ratas tratadas con losartán presentaron un área glómica mayor, un espesor menor de la pared en las arteriolas periglómicas y una luz mayor, en comparación con el grupo control (Figuras 3 y 4, A, B, C). Todo ello hizo que el grupo losartán tuviera una relación pared/luz significativamente menor que los controles en estos vasos (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Al término del presente estudio, el grupo tratado con losartán tenía una PAS significativamente menor que el grupo control. Sin embargo, a pesar de ser ambos grupos normotensos, el grupo tratado mostró un área glómica mayor con preservación de la arquitectura normal y las arteriolas periglómicas con conservación de la luz y una relación pared/luz menor.

El losartán, administrado a ratas Wistar desde el destete durante 8 meses, redujo significativamente en el riñón la atrofia tubular y la fibrosis intersticial y glomerular en comparación con los controles, lo cual sugiere que el sistema renina-angiotensina (SRA) tiene un papel importante en el fenómeno del envejecimiento natural del riñón. (5)

En el sistema cardiovascular, el envejecimiento induce cambios similares a los producidos por la hipertensión, (6) los cuales fueron atenuados por el tratamiento con losartán.

El tratamiento con enalapril o losartán durante 6 meses impidió el aumento de la presión arterial observada en ratas normales que envejecen, e indica que el SRA es aún más importante que en la regulación de la presión arterial en condiciones normales. Ambos tratamientos redujeron la fibrosis cardíaca, así como su concentración en colágeno. (7)

Asimismo, el tratamiento con losartán o enalapril mejoró la liberación de óxido nítrico (NO) de la pared aórtica, lo que aumentaría la protección vascular en ratas viejas. (8)

Estos estudios demostraron que la inhibición a largo plazo del SRA protege de los efectos del envejecimiento en el sistema cardiovascular, el riñón y el cerebro. Los autores sostienen que esta protección estaría mediada por cambios en el estrés oxidativo, especialmente a nivel mitocondrial. Por ejemplo, la angiotensina II induce liberación excesiva de radical superóxido a nivel vascular, situación atenuada por la liberación de NO. Por esta vía se disminuiría la fibrosis

y se preservaría la estructura y la función de los órganos. (7, 9)

Desde el punto de vista fisiopatológico, la variabilidad en la frecuencia cardíaca y la sensibilidad baroquimiorrefleja declinan con la edad. (10) Sin embargo, tanto en la rata como en el perro, (11, 12) el reflejo se mantiene en la senescencia.

La respiración se ajusta en respuesta a diferentes niveles de oxígeno, dióxido de carbono e hidrógeno en los líquidos corporales mediado por los quimiorreceptores centrales y periféricos. Estos últimos, localizados en los glomus carotídeo y aórtico, son los responsables de los aumentos inmediatos ventilatorios y de presión arterial que ocurren durante la hipoxia aguda. (13) Estas estructuras glómicas contienen células tipo I que liberan neurotransmisores en respuesta a la hipoxia, despolarizando las terminaciones de los nervios aferentes. (14)

En concordancia con nuestros hallazgos en un grupo seleccionado de pacientes añosos que fallecieron de alteraciones cerebrovasculares con ateromatosis carotídea importante, en quienes detectamos la alteración de las estructuras quimiorreceptoras y sus correspondientes arteriolas nutricias, (1) algunos autores sugieren que la atenuación del barorreflejo relacionada con la edad en seres humanos podría ser una consecuencia de procesos ateroscleróticos y/o hipertensivos. (15, 16) En pacientes añosos, el glomus carotídeo presentaba imágenes de actividad desmoplásica incrementada, (17) sugiriendo una alteración arteriolar que inducía la fibrosis por un mecanismo hipóxico crónico.

Se comunicó la existencia de un sistema renina-angiotensina-aldosterona local en el glomus carotídeo. (18) Cumpliría un importante papel en la adaptación cardiopulmonar a la respuesta ventilatoria hipóxica y en la homeostasis hidroelectrolítica. (18) La inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina sería la responsable de la inhibición de la fibrosis en las estructuras baroquimiorreceptoras en SHR. (19)

Recientemente encontramos una alteración significativa en la relación pared/luz de las arteriolas periglómicas y de los ganglios autonómicos en SHR y SHR tratadas con atenolol, que sugiere la existencia de cambios isquémicos en estos tejidos (observaciones no publicadas).

Nuestros hallazgos en SHR sugirieron que el glomus y los ganglios neurovegetativos carotídeos deberían considerarse órganos blanco en SHR, un modelo sistémico de hipertensión. (4)

Tabla 2. Histomorfometría del glomus carotídeo en ambos grupos estudiados

	Área glomus (μm^2)	Pared arteriolar (μm)	Luz arteriolar (μm)	Relación pared/luz
Grupo control	59.668 \pm 6.196	81,4 \pm 8,2	31,2 \pm 5,2	2,7 \pm 0,6
Grupo losartán	497.931 \pm 48.783	70,3 \pm 7,4	95,3 \pm 10,1	0,7 \pm 0,1
Prueba de la <i>t</i>	$p < 0,0001$	$p = 0,0205$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

Si bien hay muchas drogas antihipertensivas, sus papeles específicos todavía deben definirse. La selección de un antihipertensivo de primera línea deberá basarse no sólo en su eficacia y sus resultados, sino también en sus efectos sobre los órganos blanco y sus estructuras. En ese sentido, encontramos que el ramipril, pero no el atenolol, tiene un efecto protector de los cambios estructurales en el glomus y en los ganglios neurovegetativos carotídeos causados por la hipertensión arterial en SHR, un efecto que va más allá del mero control de la presión sanguínea (observaciones no publicadas).

Siguiendo esta línea de pensamiento, el tratamiento con el bloqueo de los receptores AT1 en ratas adultas normotensas preservó el área glómica y la relación pared/luz, con conservación de las luces arteriolares, ya que el grupo control, por el contrario, mostró disminución del área glómica y un aumento de la relación pared/luz. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la atrofia de las estructuras estudiadas a través del aumento de la edad se vincula principalmente con la disminución del aporte sanguíneo arterial de ellas y que la inhibición de los receptores AT1 tendría un papel destacado en la prevención de dichas alteraciones.

SUMMARY

Effects of Losartan on the Carotid Glomus in Adult Normotensive Rats

We have recently reported serious lesions in the carotid glomus and the autonomic ganglia of SHR rats, and suggested that this effect was due more to an increase in blood pressure than to aging. Subsequently we showed, also in SHR rats, that compared to atenolol, ramipril exerts a protective effect on these structures, well beyond the reduction in blood pressure. Since there are no studies describing the changes caused by AT1 blockade on glomus morphology in normotensive rats, we undertook the present study with the goal of assessing the effect of losartan on the glomus of male Wistar rats treated during 8 months.

Fourteen rats aged 4 weeks were divided into two groups: control and losartan (10 mg/kg/day in drinking water). Systolic blood pressure (SBP) was recorded at initiation and monthly thereafter. At the age of 9 months, the rats were sacrificed and their carotid glomus extracted, stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichromic and processed for histomorphometry with an image analyzer.

In the control group, SBP was 115 ± 8.1 mm Hg, whereas in the losartan group it was 105 ± 8.3 mm Hg ($p = 0.0375$). As to histomorphometry, the treated group exhibited a larger glomus area compared to the control group (497.931 ± 48.783 versus $59.668 \pm 6.196 \mu\text{m}^2$; $p < 0.0001$) and a wall/lumen ratio in the glomus arterioles of 0.7 ± 0.1 versus 2.7 ± 0.6 , respectively ($p < 0.0001$).

The control group exhibited a decrease in the glomus area and an increase in wall/lumen ratio, suggesting that the

atrophy observed with increasing age in the structures analyzed is related to arterial blood supply.

Key words > Carotid glomus - Losartan - Hypertension - Pathology

BIBLIOGRAFÍA

- Matturri L, Lavezzi AM, Silvestri F, Grana DR, Bussari R, Rossi L, et al. Severe carotid baroreceptor involvement in stroke. *Int J Cardiol* 2005;98:439-45.
- de Burgh Daly M. Peripheral arterial chemoreceptors and respiratory-cardiovascular integration. Chapter 2. Oxford: Clarendon Press; 1997. p. 16-65.
- Timmers HJ, Karemaker JM, Wieling W, Marres HA, Folgering HT, Lenders JW. Baroreflex and chemoreflex function after bilateral carotid body tumor resection. *J Hypertens* 2003;21:591-9.
- Milei J, Cao G, Grana DR, Toblli JE. Plasminogen activator inhibitor-1 and transforming growth factor-beta 1 in carotid glomus and autonomic ganglia from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2004;22:1351-9.
- de Cavanagh EM, Piotrkowski B, Basso N, Stella I, Inserra F, Ferder L, et al. Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats. *FASEB J* 2003;17:1096-8.
- Mahdavi V, Lompre AM, Chambers AP, Nadal-Ginard B. Cardiac myosin heavy chain isozymic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability. *Eur Heart J* 1984;5(Suppl F):181-91.
- Basso N, Paglia N, Stella I, de Cavanagh EM, Ferder L, del Rosario Lores Arnaiz M, et al. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regul Pept* 2005;128:247-52.
- Gonzalez Bosc L, Kurnjek ML, Muller A, Basso N. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the cardiovascular system of the normal rat. *Am J Hypertens* 2000;13:1301-7.
- Ferder LF, Inserra F, Basso N. Effects of renin-angiotensin system blockade in the aging kidney. *Exp Gerontol* 2003;38:237-44.
- Schmidt H, Francis DP, Rauchhaus M, Werdan K, Piepoli MF. Chemo- and ergoreflexes in health, disease and ageing. *Int J Cardiol* 2005;98:369-78.
- Wei JY, Mendelowitz D, Anastasi N, Rowe JW. Maintenance of carotid baroreflex function in advanced age in the rat. *Am J Physiol* 1986;250:R1047-51.
- Cox RH, Bagshaw RJ, Detweiler DK. Arterial baroreceptor reflexes in young and old racing greyhounds. *Am J Physiol* 1981;240:H383-90.
- Konig SA, Seller H. Historical development of current concepts on central chemosensitivity. *Arch Ital Biol* 1991;129:223-37.
- Prabhakar NR. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol* 2000;88:2287-95.
- McGarry K, Laher M, Fitzgerald D, Horgan J, O'Brien E, O'Malley K. Baroreflex function in elderly hypertensives. *Hypertension* 1983;5:763-6.
- Vlachakis ND, Mendlowitz M, Guia D, Gusman D. Diminished baroreceptor sensitivity in elderly hypertensives. Possible role of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1976;24:243-9.
- Glenner GG, Grimley PM. Atlas of the extra-adrenal paraganglion system. Second Series. Fascicle 9. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1974. p. 19-29.
- Lam SY, Leung PS. A locally generated angiotensin system in rat carotid body. *Regul Pept* 2002;107:97-103.
- Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, et al. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1999;17:107-14.