

Cambios estructurales en las arterias de ratas hipertensas por coartación parcial de la aorta abdominal

ELSA MANGIARUA, DIANA GRINSPON, PATRICIA RUIZ, NIDIA BASSO, ALBERTO C. TAQUINI

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires

Dirección para separatas: Instituto de Investigaciones Cardiológicas, M. T. de Alvear 2270, (1122) Capital Federal, Argentina

Se estudiaron las modificaciones estructurales en arterias de ratas sometidas a coartación parcial de la aorta abdominal. Se colocó un clip de plata de 0,6 mm de luz en la aorta abdominal por encima de ambas arterias renales. Fueron usados como controles animales intactos y ratas a las que se les colocó un clip de plata de 2 mm de luz que no produce constricción. A los dos meses y medio se registró la presión arterial en la cola y la presión arterial directa en la arteria carótida bajo ligera anestesia con éter; luego los animales fueron sacrificados y se les extrajo la aorta torácica (hasta el clip) y la aorta abdominal (por debajo del clip) junto con las arterias renales y mesentérica. En ambas muestras se determinaron la concentración y el contenido total de ácidos nucleicos y proteínas. La presión arterial medida en la cola fue similar en los tres grupos, mientras que la presión arterial medida en la carótida fue significativamente mayor en los animales coartados. El peso de la aorta torácica fue mayor en los animales hipertensos. También se observó un aumento en la concentración de proteínas y en el contenido total de ácido ribonucleico y proteínas en el segmento de aorta sometido a mayor presión en los animales coartados. No se observaron diferencias significativas en los parámetros estudiados correspondientes a las arterias por debajo de la coartación. Estos resultados sugerirían que es poco probable la existencia de un factor humoral responsable de los cambios, a menos que se tratara de un factor circulante que sólo operara asociado a una presión arterial elevada.

Desde hace tiempo se conoce que la hipertensión humana y experimental cursa con cambios estructurales vasculares.¹⁻³ Sin embargo, los factores causales de esos cambios son todavía desconocidos. La hiperplasia de las células musculares lisas de la túnica media arterial sería la principal responsable del aumento en la masa de las arterias.⁴⁻⁸ Los mecanismos que regulan y desencadenan la prolife-

ración celular son, hasta el momento, poco conocidos. El aumento de la presión intraluminal ha sido postulado como uno de los factores causales de la hiperplasia vascular.^{6,7,9-12} Sin embargo, en la hipertensión experimental también se han descrito cambios en las venas¹³⁻¹⁶ y en lechos arteriales normotensos protegidos del aumento de presión.^{14,17,18} Estos hallazgos sugieren la existencia de estímulos humorales y/o nerviosos que también participarían en la patogenia de las alteraciones vasculares en la hipertensión.

El propósito del presente trabajo fue analizar las modificaciones estructurales en arterias de ratas sometidas a coartación parcial de la aorta abdominal. Este modelo experimental ofrece la ventaja de poder analizar los mismos parámetros en lechos vasculares sometidos a niveles elevados de presión (por encima de la coartación) y en vasos sometidos a presión normal (por debajo de la coartación) pertenecientes a un mismo animal, y por lo tanto sujetos a iguales influencias humorales y nerviosas.

MATERIAL Y METODO

Inducción de la hipertensión

Se trabajó con 16 ratas macho de la cepa Wistar cuyos pesos variaron entre 150 y 200 gramos. Por vía quirúrgica lumbar se colocó un clip de plata de 0,6 mm de luz en la aorta abdominal inmediatamente por debajo del diafragma y por encima de ambas arterias renales en 6 animales (grupo coartado). Se utilizó, además, un grupo con operación simulada (S) constituido por 5 animales a los que se les colocó un clip de plata de 2 mm de luz que no provocó constricción. Otras 5 ratas fueron utilizadas como controles intactos (grupo control). Bajo ligera anestesia con éter se registró la presión arterial de la cola por el método pletismográfico. A los dos meses y medio de la operación se canuló una de las arterias carótidas y se registró la presión arterial directa bajo ligera anestesia con éter. Lue-

go fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajeron el corazón y la aorta desde el cayado hasta el lugar en que estaba colocado el clip y desde el clip hasta la bifurcación de las arterias ilíacas junto con las arterias renales y mesentérica con sus ramas más finas. De esta forma se obtuvieron dos muestras de cada rata: aorta torácica sometida a hipertensión, y lechos vasculares sometidos a normotensión. Las arterias fueron limpiadas, eliminando el tejido periadventicial, la sangre y el tejido adiposo. Las muestras así preparadas fueron pesadas inmediatamente.

Determinaciones químicas

Acidos nucleicos y proteínas. La concentración y el contenido total de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas solubles en álcali fueron determinados en todas las arterias. Los procedimientos que se detallan a continuación se realizaron en un baño de hielo. Los tejidos fueron homogeneizados en 40 volúmenes de agua destilada fría (40 mg/g de tejido). Una alícuota de 3 ml de homogeneizado se trató con 1,5 ml de ácido perclórico (APC) 0,6 N frío. Luego de centrifugar, el precipitado fue lavado dos veces con APC 0,2 N frío, descartándose el sobrenadante. El precipitado fue suspendido en 0,8 ml de hidróxido de sodio 0,3 N e incubado durante 18 horas a 37°C. El incubado fue enfriado y se agregaron 0,5 ml de APC 1,2 N. Después de centrifugar, el precipitado fue lavado dos veces con APC 0,2 N. El ARN presente en el sobrenadante se cuantificó por la reacción del orcinol.¹⁹ El precipitado fue disuelto en 2 ml de ácido tricloroacético y calentado a 90°C durante 30 minutos. El ADN se determinó mediante la reacción de la difenilamina para desoxipentosas.²⁰ En otra alícuota del homogeneizado de tejido se determinaron las proteínas siguiendo la técnica de Lowry y colaboradores.²¹

Los resultados de las determinaciones de ADN, ARN y proteínas fueron expresados en $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de tejido fresco y en $\mu\text{g}/\text{peso total de las arterias}$ en cada muestra ($\mu\text{g}/\text{arterias}$).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error típico de la media. Fueron comparados mediante el análisis de la varianza de un factor. Posteriormente se utilizó la prueba de comparación de pares de medias de Newman-Keuls.²² También se determinaron coeficientes de correlación lineal.

RESULTADOS

Presión arterial

La presión arterial medida por el método pletismográfico de la cola fue similar en los tres grupos estudiados. La presión arterial directa, medida en carótida, se encontró significativamente aumentada en los animales con coartación de aorta (Tabla 1). Los rangos fueron los siguientes (presión arterial sistólica/presión arterial diastólica): coartadas: entre 205/165 mmHg y 140/100 mmHg; S: entre 135/105 mmHg y 125/95 mmHg; controles: 130/105 mmHg y 125/90 mmHg.

Peso del corazón y de las arterias

El peso del corazón y las arterias de los tres grupos estudiados se presenta en la Tabla 1. El peso del corazón de los animales hipertensos fue mayor que el de ambos grupos controles. El peso de la aorta torácica mostró un aumento en las ratas coartadas. Este parámetro tuvo correlación lineal positiva con el nivel de presión arterial sistólica medida en carótida ($r=0,86$, $P < 0,001$) (Fig. 1). Las arterias que se encontraban por debajo del clip no presentaron esta diferencia de peso, que fue similar en los tres grupos.

Acidos nucleicos y proteínas

De acuerdo con el criterio de Wolinsky,²³ se hace necesario expresar el contenido de ADN, ARN y proteínas de la pared vascular en dos formas distintas: como concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de teji-

Tabla 1
Presión arterial y peso del corazón y de las arterias de los grupos experimentales

	Coartación	S	Control
Nº de ratas	6	5	5
Presión arterial carotídea (sistólica) (mmHg)	162 \pm 10**	132 \pm 2	127 \pm 4
Presión arterial en la cola (mmHg)	102 \pm 2	113 \pm 3	108 \pm 3
Corazón/peso corporal (mg/g)	3,13 \pm 0,33*	2,45 \pm 0,06	2,49 \pm 0,02
Arterias sobre coartación/peso corporal (mg/g)	0,13 \pm 0,01*	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00
Arterias debajo coartación/peso corporal (mg/g)	0,33 \pm 0,04	0,30 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02

Coartación: ratas con coartación parcial de la aorta abdominal; S: ratas con operación simulada; control: ratas control. *: 0,05 $< P < 0,10$; **: $P < 0,05$.

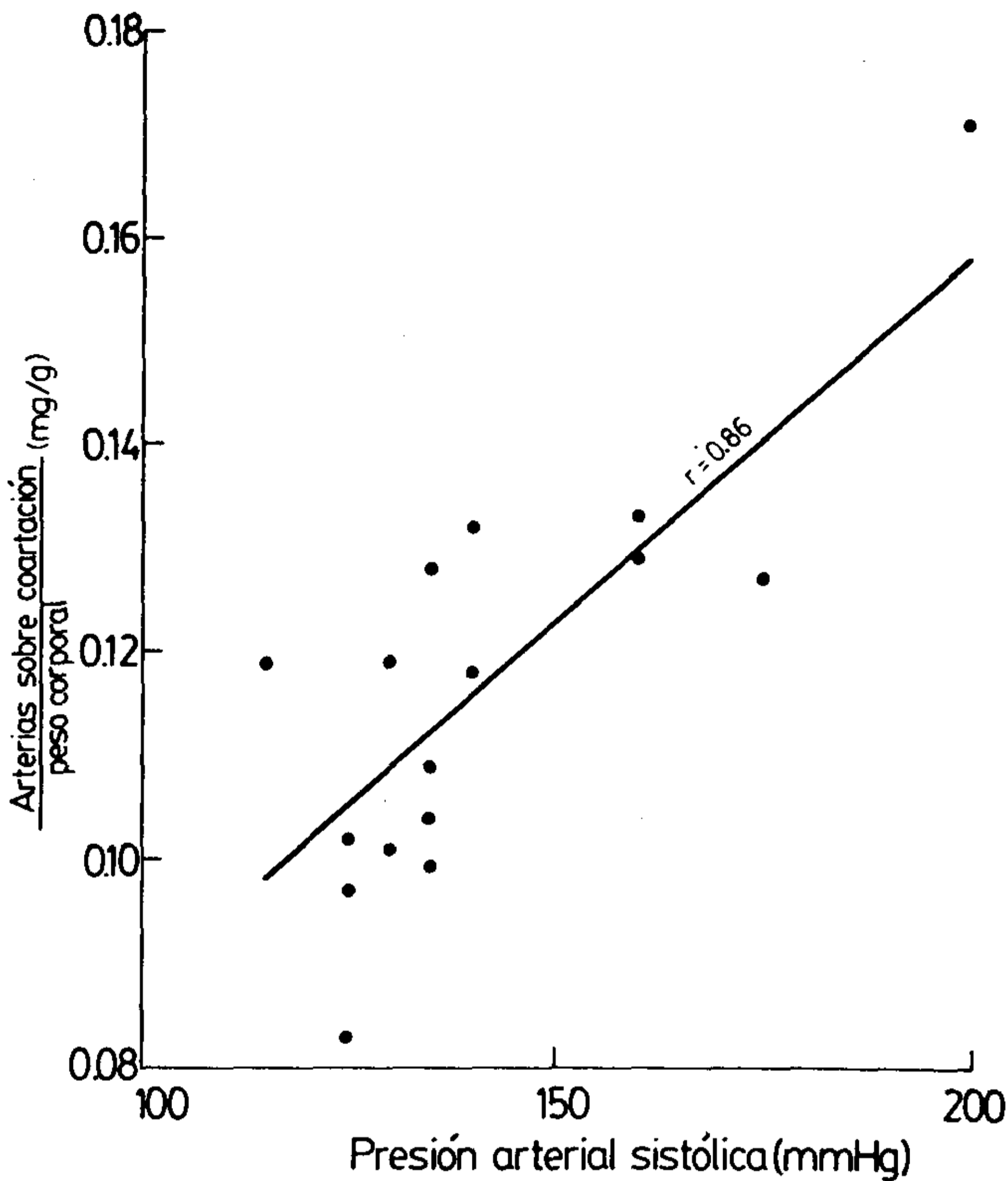


Fig. 1. Relación entre el peso corporal de las arterias sobre la coartación relativo al peso corporal y la presión arterial sistólica medida en la arteria carótida.

do húmedo) y como contenido total ($\mu\text{g}/\text{arterias}$) (Tablas 2 y 3). En las ratas con coartación de aorta, las arterias obtenidas por encima del clip mostraron un incremento en el contenido total de

ADN que no alcanzó significación estadística. La concentración de proteínas y el contenido total de ARN y proteínas fueron significativamente mayores en las arterias por encima de la coartación (Tabla 2). Los parámetros estudiados en las arterias obtenidas por debajo de la constricción fueron similares en los tres grupos estudiados (Tabla 3).

DISCUSION

En el presente estudio, realizado en ratas con coartación parcial de la aorta abdominal dos meses y medio después de la implantación del clip, el registro de la presión arterial directa en la carótida mostró un aumento significativo por encima de la constricción. Por otra parte, la medición de la presión arterial de la cola por el método pletismográfico permitió establecer que por debajo del clip no existieron variaciones. Simultáneamente, se detectaron cambios estructurales en las arterias sometidas al aumento de presión arterial y no en aquellas "protegidas" del aumento tensional. Es importante señalar que el peso de las arterias se correlacionó positiva y significativamente con el aumento de presión. El aumento de peso de las arterias de la zona hipertensa de la vasculatura podría deberse a una suma de hiperplasia e hipertrofia celular. La hiperplasia se manifiesta por el aumento en el contenido total de ADN y la hipertrofia por el aumento en la concentración de proteínas y la tendencia a valores más elevados en las relaciones ARN/ADN y proteínas/ADN.

Los resultados de Bell y Overbeck¹⁷ en el mis-

Tabla 2

Concentración y contenido total de ADN, ARN y proteínas y relaciones ARN/ADN y proteínas/ADN en la pared arterial por sobre la coartación

	Coartación	S	Control
Nº de ratas	6	5	5
ADN:			
$\mu\text{g}/100 \text{ mg tejido}$	$301,7 \pm 19,0$	$305,1 \pm 40,1$	$302,0 \pm 23,3$
$\mu\text{g}/\text{arterias}$	$157,6 \pm 10,6$	$133,4 \pm 15,1$	$133,0 \pm 10,9$
ARN:			
$\mu\text{g}/100 \text{ mg tejido}$	$266,8 \pm 12,0$	$248,9 \pm 12,5$	$251,2 \pm 6,9$
$\mu\text{g}/\text{arterias}$	$139,8 \pm 8,6$	$109,8 \pm 4,9$	$107,1 \pm 4,2$
Proteínas:			
$\mu\text{g}/100 \text{ mg tejido}$	$9.610,0 \pm 307,0^*$	$8.397,6 \pm 207,3$	$8.083,2 \pm 679,5$
$\mu\text{g}/\text{arterias}$	$5.037,3 \pm 270,1^*$	$3.724,7 \pm 206,5$	$3.588,4 \pm 320,3$
ARN/ADN	$0,90 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,09$
Proteínas/ADN	$32,2 \pm 1,5$	$29,0 \pm 3,0$	$26,8 \pm 3,0$

*: $P < 0,05$. Ver texto de Tabla 1.

Tabla 3
Concentración y contenido total de ADN, ARN y proteínas y relaciones ARN/ADN y proteínas/ADN en la pared arterial por sobre la coartación

	Coartación	S	Control
Nº de ratas	6	5	5
ADN:			
µg/100 mg tejido	289,9 ± 17,4	291,7 ± 14,6	271,0 ± 18,0
µg/arterias	405,6 ± 50,0	380,1 ± 54,3	409,0 ± 13,7
ARN:			
µg/100 mg tejido	194,6 ± 14,5	198,9 ± 10,8	199,1 ± 10,6
µg/arterias	267,8 ± 29,4	258,9 ± 36,2	261,3 ± 9,6
Proteínas:			
µg/100 mg tejido	7.338,1 ± 329,6	7.610,0 ± 555,0	7.496,1 ± 320,8
µg/arterias	10.030,4 ± 865,4	9.907,8 ± 1.471,4	9.790,5 ± 880,9
ARD/ADN	0,67 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,73 ± 0,05
Proteínas/ADN	25,6 ± 1,8	26,0 ± 1,0	27,7 ± 1,5

Ver texto de Tabla 1.

mo modelo experimental sugieren la existencia de cambios estructurales en el sector normotenso de la vasculatura, que no pueden ser atribuidos al aumento de presión intraluminal. Podrían deberse al efecto de estímulos nerviosos o humorales anormales. Posteriormente, Overbeck²⁴ confirmó estos resultados al registrar aumentos significativos en el peso de la aorta abdominal en ratas coartadas (alrededor del 26%). El aumento en el contenido de potasio en este sector aórtico¹⁴ indicaría también el desarrollo de hipertrofia o hiperplasia de las células musculares lisas vasculares. En contraposición con estos resultados y en concordancia con los hallazgos de nuestro estudio, son numerosos los investigadores que han descrito cambios estructurales en la porción hipertensa de la aorta y no en el sector arterial normotenso. Bevan y colaboradores,⁶ estudiando conejos con hipertensión por coartación parcial de la aorta abdominal, observaron aumento en el grosor de la pared arterial, en el peso, en el contenido de ADN y en la incorporación de timidina tritiada relacionados con el incremento en la presión arterial en la aorta proximal a la ligadura y en la arteria carótida común. No registraron ningún cambio en las arterias por debajo de la ligadura, donde la presión arterial permaneció dentro de niveles normales. También se ha detectado aumento en el contenido de mucopolisacáridos,²⁵ colágeno y elastina²⁶ y alteraciones en la permeabilidad¹⁸ en los sectores vasculares sometidos a alta presión y no en las arterias normotensas distales a la constricción aórtica.

En conclusión, los cambios descritos en estos experimentos y observados previamente en el mismo modelo experimental aparecieron solamente en la porción arterial proximal a la ligadura aórtica, donde la presión arterial estuvo elevada, y no fueron encontrados en las arterias normotensas distales a la ligadura. Es poco probable que un factor circulante sea responsable de dichos cambios, a menos que se tratase de un factor humoral que sólo operara asociado a una presión arterial elevada.⁶

SUMMARY

Vascular structural changes were studied after partial coarctation of the abdominal aorta. A silver clip (0.6 mm width) was placed on the aorta above both renal arteries. Intact rats and rats with a 2 mm width silver clip that produces no constriction were used as control. Two and half months later the animals were sacrificed and the thoracic aorta (down to the clip) and the abdominal aorta (below the clip) including the renal and mesenteric arteries, were excised. In both samples the concentration and total content of nucleic acids and proteins were determined. Indirect blood pressure by tail plethysmography was similar in the three groups, whereas direct blood pressure in the carotid artery was higher after aortic coarctation. The thoracic aorta weight was greater in hypertensive rats; at the same time an increase in proteins concentration and total content of RNA was observed in the same segment of the aorta subjected

to higher blood pressure. No changes were detected in the aorta below the coarctation. These results would suggest that the existence of a humoral factor involved in vascular structural alterations is not probable unless it could be active only in the presence of high blood pressure.

BIBLIOGRAFIA

1. Ewald C: Über die Veränderungen Kleiner Gefesse bei Morbus Brightii und die darauf bezüglichen Theorien. *Virchows Archiv fuer Pathologische Anatomie und Physiologie* 71: 453, 1877.
2. Jores L: Über die Arteriosklerose der Kleinen Organarteren und ihre Beziehungen zur Nephritis. *Virchows Arch Path Anat Physiol* 178: 367, 1904.
3. Pickering G: The role of the kidney in acute and chronic hypertension following renal artery constriction in the rabbit. *Clin Sci* 5: 229, 1945.
4. Mangiarua E, Basso N, Ruiz P, Taquini A: Vascular structural changes in DOC-salt hypertensive rats. *Hypertension* 3 (Suppl II): 183, 1981.
5. Mangiarua E, Basso N, Dubner D, Ruiz P, Taquini A: Evidence of early structural change in the artery wall of two-kidney one-clip Goldblatt hypertensive rats. *Clin Exp Hypert A4*: 1271, 1982.
6. Bevan R, van Marthens E, Bevan J: Hyperplasia of vascular smooth muscle in experimental hypertension in the rabbit. *Circ Res* 38 (Suppl II): 58, 1976.
7. Crane W, Dutta L: The utilization of tritiated thymidine for deoxyribonucleic acid synthesis by the lesions of experimental hypertension in rats. *J Pathol Bact* 86: 83, 1963.
8. Fernández D, Crane W: New cell formation in rats with accelerated hypertension due to partial aortic constriction. *J Pathol* 100: 307, 1970.
9. Aalkjaer C, Mulvany M: Morphological and mechanical properties of small mesenteric arteries and veins in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 107: 309, 1979.
10. Bevan R, Eggena P, Hume W, van Marthens E, Bevan J: Transient and persistent changes in rabbit blood vessels associated with maintained elevation in arterial pressure. *Hypertension* 2: 63, 1980.
11. Crane W, Ingle D: Tritiated thymidine uptake in rat hypertension. *Arch Pathol* 78: 209, 1964.
12. Hume W: Proline and thymidine uptake in rabbit ear artery segments in vitro increased by chronic tangential load. *Hypertension* 2: 738, 1980.
13. Greenberg S: Properties of intestinal and cutaneous arteries and veins in two-kidney one-clip Goldblatt hypertension. *Am J Physiol* 241: H 525, 1981.
14. Pammani M, Overbeck H: Abnormal ion and water composition of veins and normotensive arteries in coarctation hypertension in rats. *Circ Res* 38: 375, 1976.
15. Simon G: Altered venous function in hypertensive rats. *Circ Res* 38: 412, 1976.
16. Simon G: Reversibility of arterial and venous changes in renal hypertensive rats. *Hypertension* 2: 192, 1980.
17. Bell D, Overbeck H: Increase resistance and impaired maximal vasodilation in normotensive vascular beds of rats with coarctation hypertension. *Hypertension* 1: 78, 1979.
18. Detre Z, Leithner C, Winter M, Sinzinger H, Silberbauer K, Földy L, Jellinek H: Aortic response to renovascular hypertension. *Artery* 8: 398, 1980.
19. Brown A: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch Biochem* 11: 269, 1946.
20. Dische Z, Schwarz K: Mikromethode zur bestimmung verschiedener pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. *Mikrochim Acta* 2: 13, 1937.
21. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265, 1951.
22. Snedecor G, Cochran W: Statistical methods. The Iowa Univ Press, 1967.
23. Wolinsky H: Response of the rat aortic wall to hypertension: importance of comparing absolute amounts of wall components. *Atherosclerosis* 11: 251, 1970.
24. Overbeck H: Cardiovascular hypertrophy and "waterlogging" in coarctation hypertension. Role of sympathoadrenergic influences and pressure. *Hypertension* 1: 486, 1979.
25. Hollander W, Kramsch D, Farmelant M, Maddoff I: Arterial wall metabolism in experimental hypertension of coarctation of the aorta of short duration. *J Clin Invest* 47: 1221, 1968.
26. Chatelain R, Ehrhart L, Di Bello P, Dardik B, Ferrario C: Impaired arterial collagen and elastin metabolism in experimental malignant hypertension. *J Lab Clin Med* 97: 700, 1981.