

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

---



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**TESIS DOCTORAL**

---

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES  
URINARIOS PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO Y  
MONITORIZACIÓN DE LOS DAÑOS  
CARDIOVASCULARES Y RENALES DERIVADOS DE  
LA HIPERTENSIÓN Y LA DIABETES**

Omar García Sánchez  
Salamanca, 2011

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

---

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES URINARIOS PARA  
LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN  
DE LOS DAÑOS CARDIOVASCULARES Y RENALES  
DERIVADOS DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DIABETES**

**MEMORIA PRESENTADA POR OMAR GARCÍA SÁNCHEZ PARA LA  
OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE  
SALAMANCA**

**Salamanca, a 13 de julio de 2011**

Fdo. Omar García Sánchez



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

## **DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

---

LA DOCTORA Dña. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo, elaborado por el Ldo. en Biología Omar García Sánchez para optar al Grado de Doctor, con el título “IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES URINARIOS PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN DE LOS DAÑOS CARDIOVASCULARES Y RENALES DERIVADOS DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DIABETES”, ha sido realizado bajo la dirección del Doctor D. Francisco J. López Hernández y el Doctor D. Carlos Martínez Salgado, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 13 de julio de 2011.

Fdo.: Dra. Dña. María Jesús Monte Río



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

## **DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

---

EL DOCTOR D. FRANCISDO J. LÓPEZ HERNÁNDEZ, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE ESTUDIOS DE CIENCIAS DE LA SALUD (IECSCYL)-HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA, Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y EL DOCTOR D. CARLOS MARTÍNEZ SALGADO, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE ESTUDIOS DE CIENCIAS DE LA SALUD (IECSCYL)-HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA, Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

### **CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo, titulado “IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES URINARIOS PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN DE LOS DAÑOS CARDIOVASCULARES Y RENALES DERIVADOS DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DIABETES” presentado por D. Omar García Sánchez para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considero que cumple las condiciones necesarias, autorizando su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 13 de julio de 2011.

Fdo.: Dr. D. Francisco J. López Hernández

Fdo.: Carlos Martínez Salgado

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. HIPERTENSIÓN</b>	3
1.1 Breve sinopsis histórica sobre el sistema circulatorio y la presión Arterial	3
1.2. Definición de hipertensión arterial	5
1.3. Tipos de hipertensión	6
1.4. Epidemiología	8
1.5. Mecanismos de la hipertensión	10
1.5.1. Volumen intravascular	12
1.5.2. Moduladores de la relación presión-natriuresis	17
A. Sistema nervioso autónomo	17
B. Sistema renina-angiotensina	19
C. Mecanismos vasculares	21
1.6. Consecuencias patológicas de la hipertensión	24
1.7. Diagnóstico de la hipertensión y monitorización	28
1.8. Tratamiento de la hipertensión	33
1.8.1. Tratamiento farmacológico	34
1.8.2. Tratamiento no farmacológico	39
<b>2. DIABETES MELLITUS</b>	40
2.1. Notas históricas de la diabetes mellitus	40
2.2. Definición	41
2.3. Clasificación	41
2.4. Epidemiología	44
2.5. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus y su epidemiología	47
2.6. Criterios diagnósticos de la diabetes mellitus	49

2.7. Tratamiento de la diabetes mellitus	53
<b>3. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN LA DIABETES MELLITUS</b>	<b>56</b>
3.1. Comorbilidad	56
3.2. Prevalencia	57
3.3. Consecuencias	58
3.4. Fisiopatología	58
3.5. Diagnóstico de la hipertensión en la diabetes	61
3.6. Tratamiento para pacientes hipertensos y diabéticos tipo 2	62
<b>OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>RESULTADOS, METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
1. Artículos I: Hyperglycemia and hypertension synergize to cause incipient renal alterations resulting in increased blood-borne NGAL urinary excretion in rats: Potential diagnostic applications	69
2. Artículo II: Sustained hypertension increases KLK9 urinary excretion: Application to the early diagnosis of hypertensive nephropathy and cardiac hypertrophy	92
<b>DISCUSIÓN FINAL</b>	<b>115</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>127</b>

# INTRODUCCIÓN



# 1. HIPERTENSIÓN

## **1.1.BREVE SINOPSIS HISTÓRICA SOBRE EL SISTEMA CIRCULATORIO Y LA PRESIÓN ARTERIAL**

Los primeros escritos conocidos sobre el sistema circulatorio se encuentran en el papiro de Ebers (siglo 16 a.C.), un antiguo papiro médico egipcio, en el cual se reconoce la conexión del corazón con las arterias y el corazón es descrito como el centro del cuerpo. Posteriormente, aproximadamente 400 años a.C., aparecen las descripciones hipocráticas de las arterias y venas. Hipócrates creía que las venas transportaban aire. En Pérgamo, 600 años después, Galeno demostró que tanto en las arterias como en las venas circulaba sangre, pero pensó que lo hacía en forma anterógrada y retrógrada desde y hacia el corazón por el sistema arterial y el venoso de manera independiente y sin conexión alguna. Estos conceptos no se modificaron en más de 1000 años.

En 1242, el físico árabe Ibn al-Nafis se convirtió en la primera persona en describir con precisión el proceso de la circulación pulmonar. Su teoría no fue aceptada por sus contemporáneos. Posteriormente, en el siglo XVI Miguel Servet fue el primer europeo en describir la función de la circulación pulmonar. En 1616, William Harvey demostró la circulación unidireccional e imaginó la existencia de capilares, que fueron evidenciados histológicamente 30 años después por el italiano Marcello Malpighi (Stevens, 1978). La primera medición de la presión arterial se debe al sacerdote inglés Stephen Hales. Su método descrito en 1733 era invasivo y de escasa aplicación práctica, aunque permitió acrecentar el conocimiento acerca de la presión en forma considerable (Hoel y Howard, 1997).

El primer esfigmomanómetro no invasivo se debe a Ritter von Basch, pero luego fue modificado y transformado en el instrumento que se usa hoy en día, en 1896 por el pediatra italiano Scipione Riva-Rocci (Lyons y Petrucelli, 1987). Otro avance en el conocimiento del sistema circulatorio fue realizado en 1836 por Richard Bright, el cual describe la hipertrofia del ventrículo izquierdo en pacientes muertos con nefritis y proteinuria y sugiere que tal hipertrofia, en ausencia de lesiones valvulares se debe a un

aumento de la resistencia al flujo en los pequeños vasos arteriales que atribuye a una alteración en la calidad de la sangre (Basso, 2001).

René Laennec había inventado el estetoscopio en 1816, y utilizándolo como complemento del esfigmomanómetro para controlar el pulso arterial mientras el manguito era inflado y desinflado, el médico militar ruso Nicolai S. Korotkoff descubrió en 1905, que los sonidos del pulso desaparecían al disminuir la presión del manguito en un punto coincidente con la diástole cardíaca. Desde entonces se conoce a este fenómeno como los “sonidos de Korotkoff” (Lyons y Petrucelli, 1987). Korotkoff, utilizando el esfigmomanómetro de Riva-Rocci, aplicaba el estetoscopio sobre la arteria braquial durante el desinflado progresivo y lento del brazalete. Con esto, llegó a identificar y describir hasta 5 tipos distintos de ruido, que la sangre provoca al pasar a través de la arteria en estado de descompresión paulatina. Estos sonidos fueron clasificados por Korotkoff en 5 fases. En la primera de ellas ocurre la aparición de sonidos descritos como claros golpecitos correspondientes a la aparición del pulso palpable, que indica la presión sistólica. En la última fase los sonidos desaparecen completamente y corresponde con la presión diastólica ([http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/medicion\\_tension\\_arterial.htm](http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/medicion_tension_arterial.htm)).

En el siglo XX se construyeron otros aparatos para realizar mediciones tensionales, por ejemplo los oscilómetros de Pachon y de Plesch, así como el manómetro aneroide y se continuó estudiando en profundidad todo lo relacionado con el sistema circulatorio. Uno de los trabajos más conocidos de este siglo es el Estudio del Corazón de Framingham. Comenzó en 1948 y su cometido era identificar los factores comunes o características que contribuyen a las enfermedades cardiovasculares. Este estudio ha seguido de cerca el desarrollo de estas enfermedades por un largo periodo de tiempo a través de tres generaciones de participantes. Uno de los muchos datos obtenidos de dicho estudio es, por ejemplo, que en los pacientes el riesgo de coronariopatías aumentó progresivamente al hacerlo la presión sistólica o diastólica, tanto en personas maduras como ancianos (<http://www.framinghamheartstudy.org>).

## **1.2. DEFINICIÓN DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

La presión arterial es una variable continua (El Corazón. Manual De Cardiología). De manera general se considera hipertensión arterial (HTA) cuando en repetidas tomas la presión arterial (PA) está por encima de 140 y/o 90 mmHg, de PA sistólica o diastólica, respectivamente (Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica). Es importante distinguir la diferencia entre los términos presión arterial elevada e hipertensión arterial. En el primero se refiere a un aumento en los niveles normales de la presión arterial en un momento concreto volviendo a sus valores basales posteriormente y, en cambio, en la hipertensión este aumento de los valores se mantiene a lo largo del tiempo, requiriéndose algún tipo de tratamiento para atenuar este aumento anormal de la presión.

La hipertensión duplica el peligro de que aparezcan enfermedades cardiovasculares, incluidas coronariopatías e insuficiencia cardíaca congestiva, accidente isquémico y hemorrágico de vasos cerebrales, insuficiencia renal, y arteriopatías periféricas. El incremento tensional suele acompañarse de otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, y es precisamente tal riesgo el que incrementa el impacto total de los factores de peligro. La administración de antihipertensivos disminuye netamente los peligros de las enfermedades cardiovasculares y renales, pero un gran segmento de la población de hipertensos recibe tratamientos inadecuados o no los recibe o no se consigue que estos pacientes hagan los tratamientos de manera efectiva y continuada. Así, desde el punto de vista clínico también podría definirse la hipertensión como el nivel de presión arterial en que el tratamiento que se emprenda disminuye la morbilidad y la mortalidad de origen tensional (Harrison. Principios de medicina interna).

Todos estos antecedentes hacen que nuevos estudios en profundidad sobre la hipertensión sean siempre necesarios debido a que gran parte de la población sufre dicha enfermedad o la sufrirá en un futuro próximo. El problema de los tratamientos actuales es que son solamente paliativos, por lo tanto si se retiran la presión arterial vuelve a aumentar. El futuro de los tratamientos de la hipertensión está en la aparición de tratamientos etiológicos que actúen sobre las causas que provocan esta enfermedad pudiendo eliminar completamente esta patología.

### 1.3. TIPOS DE HIPERTENSIÓN

La presión arterial se clasifica a tenor de los valores de presión que tiene el individuo. La clasificación más común es la siguiente:

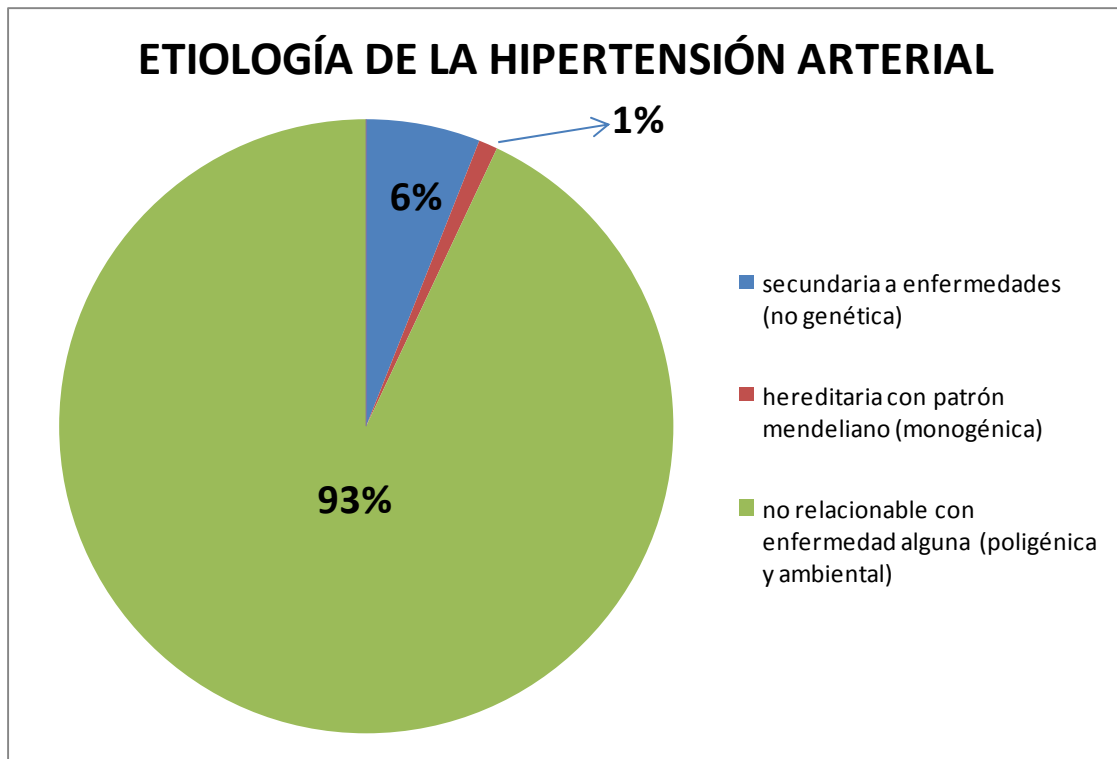
Categoría	Sistólica	Diastólica
Optima	<120	<80
Normal	120–129	80–84
Normal alta	130–139	85–89
Grado 1 de hipertensión	140–159	90–99
Grado 2 hipertensión	160–179	100–109
Grado 3 hipertensión	180	110
Hipertensión sistólica aislada	140	<90

Fuente: <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=47329&pagina=4>

Teniendo en cuenta la etiología existen dos tipos de hipertensión arterial:

- a) La hipertensión esencial, primaria, o idiopática: es aquella en la que no se encuentra una etiología determinada. Ocurre en la mayoría de los casos (90-95%). Posiblemente sea consecuencia de una interacción entre factores ambientales y genéticos, es decir, la hipertensión es de origen multifactorial (herencia, constitución, raza, factores psicológicos, tipo de alimentación y hábitos de vida). Su prevalencia es mayor con el envejecimiento, y los sujetos que tienen presiones arteriales relativamente altas en la etapa juvenil están expuestos a un mayor riesgo de que ulteriormente aparezca hipertensión.
- b) Hipertensión secundaria: En un pequeño número de casos (5-6%), la hipertensión es debida a una enfermedad subyacente o a un factor externo. Es importante su diagnóstico, pues en la mayoría de los casos se produce hipertensión severa y puede curarse. Las causas pueden ser: congénitas (coartación de aorta...), renales (glomerulonefritis...), endocrinas (hiperaldosteronismo, feocromocitoma), vasculares (poloarteritis nodosa...),

farmacológicas (corticoides, anticonceptivos...) o por agentes externos (regaliz....) (Sociedad Española de Hipertensión - Liga Española para la lucha contra la hipertensión arterial-SEH-LELHA).



**Figura 1.** Prevalencia de las distintas etiologías de la hipertensión arterial.

Existe otra terminología respecto a la hipertensión arterial para denominar tipos o situaciones concretas relacionadas con la hipertensión como son, por ejemplo:

- HTA sistólica “aislada”: únicamente está elevada la PA sistólica. Ocurre en ancianos, normalmente.
- “Hipertensión aislada en la consulta” ó “HTA de bata blanca”: PA elevada en consulta y normal en domicilio, tiene menor incidencia de afectación de órganos diana. También el 20% de los hipertensos obtienen lecturas de la PA considerablemente mayores en la consulta del médico o en el hospital que en otros ambientes. No se conoce exactamente cómo y cuándo tratar a estas personas. Se recomienda la realización de modificaciones en el estilo de vida (El Corazón. Manual De Cardiología).

- “Hipertensión ambulatoria aislada” o “HTA enmascarada”: cifras normales de PA en la consulta y elevadas en medición ambulatoria o domiciliaria.
- “HTA maligna”: cuando se producen hemorragias, exudados o edema papilar en el fondo de ojo. El paciente tiene una PAD mayor a 120 mmHg.
- “HTA refractaria”: descartada causa secundaria, es decir, un trastorno específico, no se controla la hipertensión con 3 fármacos, siendo uno de ellos un diurético.
- Crisis hipertensiva: PAS mayor de 210 mmHg o PAD mayor de 120 mmHg:
  - o Emergencia hipertensiva: crisis hipertensiva con daño agudo o continuado de órganos diana.
  - o Urgencia hipertensiva: crisis hipertensiva sin daño agudo o continuado de órganos diana.
- Hipertensión renovascular: es la que surge por obstrucción de una arteria renal, es una forma de la enfermedad que puede ser curable.
- Hipertensión por aldosteronismo primario: la producción excesiva de aldosterona por aldosteronismo primario es una forma de hipertensión que puede ser curada (Harrison. Principios de medicina interna).

### **1.4. EPIDEMIOLOGÍA**

Los niveles de presión arterial, la rapidez con que aumenta la presión por acción del envejecimiento y la prevalencia de hipertensión varían con el país y con la subpoblación dentro de una región o país. Se ha calculado que la hipertensión explica el 6% de los fallecimientos a nivel mundial (Harrison. Principios de medicina interna).

La hipertensión presenta una prevalencia considerable en los países desarrollados, que afecta casi al 40% de los adultos (Kearney y cols., 2005) y al 3,5% de los adolescentes (Joseph Rynn y Bonita Falkner, 2011).

En España la HTA también supone un importante problema de salud pública. En la población general adulta de España la prevalencia de la HTA es de aproximadamente un 35%, que llega al 40% en edades medias y a más del 60% en mayores de 60 años, y esto equivale en total a unos 10 millones de individuos adultos (Banegas, 2005). Por otro lado se ha estimado una prevalencia de HTA en Castilla y León del 38,7%. En conjunto, los varones presentan un mayor porcentaje (40,4%) que las mujeres (37,4%). También se puede apreciar una mayor prevalencia de HTA en el medio rural (41,3%) que en el urbano-semiurbano (36,9%) (Vega Alonso, 2008).

En el contexto internacional la prevalencia de la HTA en adultos en España y otros países europeos es francamente superior (41%) a la de otros países como Canadá (27%) y Estados Unidos (30%). Estas diferencias parecen ser menores, pero en el mismo sentido, en los adultos mayores de 60 años en la población general de esos países. Las razones de esas diferencias no son claras, pero factores ambientales y terapéuticos podrían estar contribuyendo a ello. Lo que sí parece claro es que estas diferencias en la magnitud de la HTA se correlacionan estrechamente con la mortalidad por ictus entre estos países (Banegas, 2005; Yoon y cols., 2010).

En Estados Unidos, con base en los resultados del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), aproximadamente el 30% de los adultos estadounidenses, lo que equivale a aproximadamente 58,4 millones de personas, tienen hipertensión (definida por cualesquiera de los puntos siguientes: presión sistólica de 140 mm Hg o mayor; presión diastólica de 90 mm Hg o mayor, y los que reciben antihipertensivos). El impacto de la hipertensión aumenta con el envejecimiento, y su prevalencia es del 65,4% en personas de 60 años o mayores (Harrison. Principios de medicina interna). Entre 1999-2000 y 2007-2008, la prevalencia de la hipertensión arterial no cambió, pero el control de la hipertensión aumentó entre las personas con hipertensión arterial (Egan y cols., 2010). A pesar de las mejoras considerables en la sensibilización, tratamiento y control de la hipertensión, en 2007-2008, aproximadamente la mitad de los adultos con hipertensión no tenían su presión arterial

bajo control (Yoon y cols., 2010). Datos recientes sugieren que la prevalencia de esta enfermedad en Estados Unidos quizá vaya en aumento, tal vez como consecuencia de la mayor incidencia de obesidad.

Por otro lado factores ambientales y genéticos pueden contribuir a las variaciones regionales y raciales de la presión arterial y de la prevalencia de hipertensión. Los estudios de sociedades en fase de “aculturación” y de emigrantes de un entorno más o menos urbanizado, señalan que el ambiente hace una contribución profunda a la presión arterial. La obesidad y el incremento ponderal son factores de riesgo independientes y potentes de hipertensión. Se ha estimado que el 60% de los hipertensos tienen exceso ponderal mayor de 20%. Entre las poblaciones, la prevalencia del incremento de tensión depende de la ingesta de cloruro de sodio con los alimentos, y el aumento por el envejecimiento pudiera ser intensificado por el consumo grande de la sal de mesa. La ingesta baja de calcio y potasio en alimentos también pudiera contribuir al peligro de hipertensión. Factores ambientes adicionales que a veces contribuyen a la hipertensión comprenden el consumo de alcohol, el estrés psicosocial y niveles bajos de actividad física.

Los estudios sobre adopción, gemelos y familia corroboran un componente hereditario notable en los niveles de presión arterial y de la hipertensión. Existe la posibilidad de heredar las características de la presión arterial en límites de 15 a 35%. La mayor presión arterial antes de los 55 años afecta con una frecuencia 3.8 veces mayor a sujetos que tienen el antecedente familiar de hipertensión. En casi todas las personas es posible que la hipertensión constituya una enfermedad poligénica, en la cual un solo gen o una combinación de genes actúan de manera concertada y conjunta con exposiciones ambientales para contribuir sólo con un efecto leve en la presión arterial (Harrison. Principios de medicina interna).

### **1.5. MECANISMOS DE LA HIPERTENSIÓN**

Primeramente es necesario entender los factores que intervienen en la regulación de la presión arterial normal y su incremento. Los factores principales son el volumen



intracelular, el sistema nervioso autónomo, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y los mecanismos vasculares (Harrison. Principios de medicina interna).

El control de la presión arterial a corto plazo por el sistema nervioso simpático se produce principalmente a través de sus efectos sobre la resistencia vascular periférica total y la capacitancia, y sobre la capacidad del corazón.

Sin embargo, el organismo también dispone de mecanismos potentes para regular la presión arterial a lo largo del tiempo. Este control a largo plazo de la presión arterial está íntimamente relacionado con la homeostasis del volumen del líquido en el organismo, que está determinada por el balance entre la ingestión y la eliminación de líquidos. Para la supervivencia a largo plazo la ingestión y la eliminación de líquidos deben estar equilibradas con precisión, una función que es realizada por varios mecanismos de control nerviosos y hormonales y por los sistemas de control locales dentro de los riñones que regulan la excreción de sal y agua (Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica).

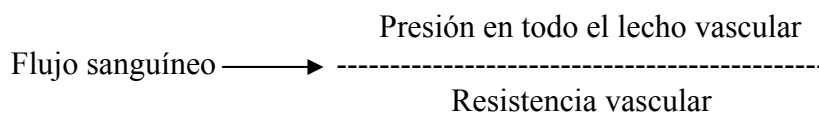
Actualmente numerosas líneas de investigación sugieren que es el mecanismo renal regulador del balance de sodio, y no el grado de resistencia periférica total (RPT), el que controla la presión arterial a largo plazo. Así pues, la hipertensión sostenida implica necesariamente una alteración en la relación presión-natriuresis, circunstancia que se observa en todos los pacientes hipertensos y modelos de hipertensión experimentales, así como en sus riñones aislados (López Novoa y López Hernández, 2006). Este término de natriuresis por presión incluye la diuresis por presión que se refiere al efecto del aumento de la presión arterial que incrementa la excreción de volumen de orina y la natriuresis por presión que se refiere al aumento de la excreción de sodio que se produce cuando se eleva la presión arterial. Debido a que ambos fenómenos aparecen en paralelo, normalmente se conocen a estos mecanismos simplemente como natriuresis por presión (Guyton and Hall. Tratado de Fisiología médica).

Otros datos que corroboran la importancia del mecanismo renal en el control de la presión son los experimentos de transplante renal entre hipertensos y normotensos que han puesto de manifiesto que la hipertensión viaja con el riñón. Más aún, el

aumento de la RPT sin aumento simultáneo de volumen extracelular no produce hipertensión; produce un aumento de PA transitorio, pero no HTA y, viceversa, el aumento de volumen sin aumento de la RPT, induce hipertensión. La hemodinámica y la presión intersticial de la médula renal se perfilan como los responsables del mecanismo de presión-natriuresis. Sorprendentemente, estudios recientes sugieren que la actividad simpática renal controlada por los barorreceptores tiene un cierto papel en el control de la presión arterial a largo plazo y en el desarrollo o el mantenimiento de la hipertensión (López Novoa y López Hernández, 2006).

### **1.5.1.VOLUMEN INTRAVASCULAR:**

El volumen del líquido extracelular está compuesto por los volúmenes de los compartimentos sanguíneo e intersticial. Así, en general, las alteraciones en el volumen total de líquido extracelular se acompañan de cambios proporcionales en el volumen plasmático. El sodio es predominantemente un ion extracelular y es el osmolito más importante en la regulación del volumen de líquido extracelular. Si la ingestión de sodio rebasa la capacidad del riñón para excretarlo, el organismo retiene sodio y agua, el volumen intravascular se expande y, como consecuencia, aumenta el gasto cardiaco y la presión arterial. Sin embargo, muchos lechos vasculares, incluidos los de los riñones y el encéfalo, tienen la capacidad de autorregular el calibre de sus vasos para conservar el flujo sanguíneo constante ante cambios de presión arterial. Ante un aumento de presión derivado del incremento de gasto cardiaco, las arterias y arteriolas tisulares se contraen, lo que aumenta la resistencia periférica total.



El incremento inicial de la presión arterial en relación con la expansión del volumen vascular está vinculado con el aumento del gasto cardiaco; sin embargo, con el paso del tiempo aumenta la resistencia periférica y el gasto se revierte al nivel normal. El efecto del sodio en la presión arterial depende de que el organismo reciba sodio junto

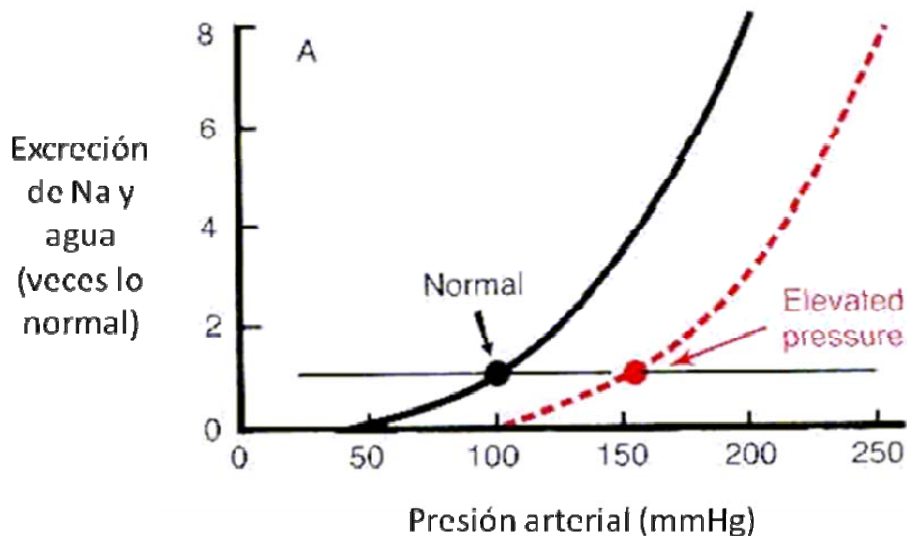
con cloruro; las sales sódicas diferentes de las de cloruro ejercen mínimo o nulo efecto en la presión arterial. Conforme aumenta la presión arterial en respuesta a la gran cantidad de cloruro de sodio ingerido, se incrementa la excreción de dicho ión por la orina y se conserva el balance del ión a expensas del aumento en la presión arterial. El mecanismo de esta “natriuresis de tensión” pudiera incluir un sutil aumento en la filtración glomerular, menor capacidad de absorción de los túbulos renales y posiblemente factores hormonales como el factor natriurético auricular. En personas con una menor capacidad para excretar sodio se necesitan aumentos mayores de la presión arterial para lograr la misma natriuresis y el balance de dicho ión.

La hipertensión que depende de cloruro de sodio pudiera ser consecuencia de una menor capacidad de los riñones para excretar sodio, por alguna enfermedad intrínseca o por una mayor producción de hormonas que retienen sodio (mineralocorticoides), con lo cual aumenta la resorción de sodio por el túbulo renal. El fenómeno recién mencionado puede intensificarse al aumentar la actividad nerviosa del riñón. En cada una de las situaciones mencionadas se necesita una mayor presión arterial para alcanzar el balance de sodio (es decir, el fenómeno de natriuresis de tensión). Por el contrario, los trastornos natriopénicos (pérdida de sodio) se acompañan de bajos niveles de presión arterial (Harrison. Principios de medicina interna).

Durante las cuatro últimas décadas se ha ido consolidando la evidencia de que el riñón tiene un papel predominante en el control a largo plazo de la presión arterial (Guyton, 1991). La formulación más sencilla de esta teoría es que cualquier variación mantenida de la presión arterial, sea cual sea su origen o naturaleza, se acompaña de una modificación de la función renal que revierte la presión arterial a sus valores de partida. Por tanto, como veremos más adelante, para que pueda desarrollarse hipertensión es necesario que ocurra una “anomalía” de la función renal de forma que el riñón se reajusta de forma que el balance hidroelectrolítico se consigue en condiciones de una mayor presión arterial. Sin embargo, esto no quiere decir que, obligatoriamente, la causa primaria de la hipertensión resida en el riñón. Significa que la función renal ha de estar alterada para que ocurra la hipertensión. Es posible que sean alteraciones extrarrenales (por ejemplo, endocrinas o neurocrinas) las que, al modificar el manejo renal de agua y electrolitos, expliquen la aparición de la hipertensión (López Novoa y López Hernández, 2006).

En resumen, el riñón regula la presión arterial regulando el balance de sodio. La función normal del riñón consiste en mantener un balance entre la ingesta y la eliminación de agua y electrolitos, de manera que el volumen y las características físicas de los compartimentos líquidos del organismo se mantienen constantes, siempre y cuando no haya cambio en la presión arterial (López-Novoa, 2004). La función renal tiene tres características que le otorgan el papel clave en la regulación a largo plazo de la presión arterial: depende de la presión arterial, no se adapta, y su ganancia homeostática es infinita (López Novoa y López Hernández, 2006).

El riñón es capaz de acusar los cambios en presión arterial, específicamente los cambios en la presión de perfusión renal, y modificar la excreción de agua y electrolitos en función de estos cambios. En concreto, como demostraron los trabajos del grupo de Guyton (Guyton, 1989) hay una relación directa entre la natriuresis y la presión de perfusión renal, de forma que si sube la presión de perfusión, aumenta la natriuresis y viceversa. Este es el mecanismo básico por el que se relacionan la ingesta de sodio, la excreción de sodio y la presión arterial. Por tanto en condiciones fisiológicas para una presión arterial determinada la ingesta de sodio es igual a la excreción de sodio. Si aumenta la presión arterial sin que aumente la ingesta de sodio, aumenta la excreción de sodio y agua (curva presión-natriuresis, figura 1) y, por tanto, se produce un balance negativo de sodio y agua. Como consecuencia de esto, un aumento en la presión de perfusión tiene como consecuencia una disminución del volumen extracelular y, por tanto, del volumen sanguíneo, que, como consecuencia, produce una reducción de la presión arterial hasta llegar a la presión arterial inicial, situación en la que la excreción de sodio vuelve a igualarse a la ingesta y vuelve así a conseguirse un balance cero. El efecto contrario ocurre cuando disminuye la presión arterial sin disminuir la ingesta de sodio. Hay que darse cuenta de que estos ajustes renales de la presión arterial se hacen a costa de cambios en el volumen sanguíneo, que ocurren durante los días siguientes a la alteración sostenida de la presión. Es el cambio en volumen sanguíneo y no la excreción de sodio y agua *per se* el que determina los cambios en presión arterial (López Novoa y López Hernández, 2006).



**Figura 2.** La representación gráfica de la evolución de la excreción de sodio en función de la presión arterial muestra que en la hipertensión (línea roja) es necesaria una presión más alta que en condiciones normales (línea negra) para producir la misma excreción de sodio y alcanzar el balance electrolítico, es decir, el equilibrio entre la ingesta y la excreción de agua e iones. En la hipertensión patológica, la curva de presión-natriuresis está desplazada a la derecha. Fuente: Guyton and Hall. Tratado de Fisiología médica.

Hay que tener en cuenta que pequeños cambios en el volumen sanguíneo son capaces de inducir grandes cambios en la presión arterial (Guyton y cols., 1975). Por ejemplo, varios experimentos han demostrado que el aumento de la presión arterial de sólo unos milímetros de mercurio en el ser humano puede aumentar al doble la eliminación renal de agua y también la eliminación de sal (Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica).

Una característica muy importante del mecanismo de natriuresis de presión es que no se adapta con el tiempo, como les ocurre a otros mecanismos de regulación de la presión arterial cuando ésta se mantiene elevada o disminuida durante un largo periodo de tiempo como, por ejemplo, los barorreceptores (Guyton, 1990; Cowley, 1992), aunque algunos autores rebaten la transitoriedad de la acción de control de los barorreceptores (Thrasher, 2004; Lohemeier y cols., 2005). Al no adaptarse en el tiempo el sistema de control renal de la presión arterial es capaz de devolver los niveles de presión a los que había antes del cambio (Guyton y cols., 1984; Guyton, 1990), lo que la convierte en un instrumento esencial para el control a largo plazo de la presión arterial (López Novoa y López Hernández, 2006). Esta propiedad de la función renal ya fue expuesta por Guyton y sus colaboradores en 1966, y hasta la fecha no ha habido objeciones serias que demuestren que es incorrecta (Guyton, 1990). Por el contrario, son

muchas las observaciones experimentales que apoyan de forma directa o indirecta la hipótesis de que la natriuresis-diuresis de presión es el principal mecanismo de control de la presión arterial a largo plazo y de que su alteración es la causa básica de la génesis y el mantenimiento de la hipertensión (López Novoa y López Hernández, 2006).

Por otro lado, el control de la presión que ocurre por el mecanismo de control de líquidos renal-corporal, demuestra una “ganancia infinita por retroalimentación”. Gracias a este mecanismo, tanto si la presión arterial aumenta como si disminuye, el riñón modifica la excreción de sal y agua provocando variaciones de líquido y volumen sanguíneo que hace que la presión arterial recupere el punto de equilibrio exacto (figura 1). Como una vez corregida por completo la presión arterial no existe ningún error restante, este sistema de retroalimentación tiene una ganancia infinita.

Un dato curioso es que en la historia filogenética del desarrollo animal este sistema de líquidos renal-corporal del control de la presión es uno de los más primitivos y sólo se encuentra totalmente operativo en uno de los vertebrados inferiores, el pez babosa. Igual que en el pez babosa, este sistema de control de la presión también en el ser humano es la base fundamental del control de la presión arterial a largo plazo, aunque a través de las etapas de la evolución se han añadido muchos sistemas de refinamiento que hacen que sea mucho más exacto en su control en el ser humano. Un refinamiento especialmente importante es la adición del mecanismo renina-angiotensina (Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica).

Otro dato a tener en cuenta es que para cualquier nivel de presión arterial, la excreción de sodio es menor en los hipertensos que en los normotensos. Esto se ha observado en humanos hipertensos esenciales (Omvik y cols., 1980) y en distintos modelos animales de hipertensión arterial, tanto genéticos como secundarios, incluyendo ratas espontáneamente hipertensas (SHR), ratas hipertensas Lyon, ratas transgénicas para el gen ren-2 de la renina de ratón, modelos de hipertensión sensibles a sal Dahl y Sabra y la hipertensión inducida por infusión de angiotensina II (Cowley y cols., 1996; López Novoa y López Hernández, 2006).

Otro grupo de evidencias que apoyan el papel primario de la función renal en la génesis de la presión arterial se basa en el hecho de que los tratamientos farmacológicos

antihipertensivos modifican la curva presión/natriuresis devolviéndola a su forma fisiológica (Cowley y cols., 1995, 1996). De hecho, la infusión intrarrenal de fármacos antihipertensivos, a dosis que no son hipotensoras *per se* cuando se administran sistémicamente, es capaz de restaurar la relación presión-natriuresis a sus valores normales (Cowley y cols., 1995). Asimismo, se puede producir hipertensión experimental, modificando la capacidad renal de excretar sodio y agua, por ejemplo, produciendo una estenosis de la arteria renal o la aorta suprarrenal, como son los diferentes modelos de Goldblatt, por eliminación o infarto de buena parte de la masa renal (modelo de nefrectomía 5 sextos), por administración exógena de sustancias que inducen al riñón a retener agua y sal (DOCA, aldosterona, angiotensina II, L-NAME, etc.). Tanto en éstos como en cualquier otro modelo de hipertensión, cualquier maniobra que reduzca la excreción de agua y sal produce hipertensión (López Novoa y López Hernández, 2006).

### **1.5.2. MODULADORES DE LA RELACIÓN PRESIÓN-NATRIURESIS**

#### **A) SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO**

El sistema nervioso autónomo conserva la homeostasia cardiovascular por envío de señales de presión, volumen y de quimiorreceptores. Los reflejos adrenérgicos modulan la presión arterial, tanto instantáneamente como a corto plazo, y la función adrenérgica, de manera concertada con factores hormonales y de volumen, lo que contribuye a la regulación a largo plazo de la presión arterial. Las tres catecolaminas endógenas son noradrenalina, adrenalina y dopamina. Las tres son importantes en la regulación cardiovascular tónica y fásica. Las neuronas adrenérgicas sintetizan noradrenalina y dopamina (precursoras de la noradrenalina) que son almacenadas en vesículas dentro de la neurona. Al estimular la neurona se liberan neurotransmisores en la sinapsis y a sitios receptores en tejidos “efectores”. Más adelante el transmisor es metabolizado o captado por la neurona por un proceso de recaptación activo. Se sintetiza adrenalina en la médula suprarrenal y es liberada a la circulación con la estimulación de las glándulas suprarrenales (Harrison. Principios de medicina interna).

La actividad de los receptores adrenérgicos está mediada por las proteínas reguladoras de la unión con nucleótido de guanosina (proteína G) y por las concentraciones intracelulares de los segundos mensajeros que siguen en la cadena de señalización (corriente abajo). Además de la afinidad y el número de receptores, la reacción fisiológica a las catecolaminas puede ser modificada por la eficiencia del acoplamiento receptor/efector en un sitio “distal” al de unión con receptor. La noradrenalina y la adrenalina son agonistas de todos los subtipos de receptores adrenérgicos, aunque con afinidad variable. Basado en aspectos fisiológicos y farmacológicos se han dividido a los receptores adrenérgicos en dos tipos principales: alfa y beta. Los tipos en cuestión se han diferenciado todavía más en receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Los receptores alfa son ocupados de manera más ávida y activados por la noradrenalina que por la adrenalina, y la situación contraria es la que se observa con los receptores beta. Los receptores  $\alpha_1$  están situados en las células postsinápticas del músculo liso vascular y desencadenan la vasoconstricción. Los receptores  $\alpha_2$  están en las membranas presinápticas de terminaciones nerviosas posganglionares que sintetizan noradrenalina. Los receptores  $\alpha_2$ , al ser activados por las catecolaminas, actúan como controladores de retroalimentación negativa e inhiben la ulterior liberación de noradrenalina. La activación de los receptores  $\beta_1$  del miocardio estimula la rapidez y la potencia de la contracción cardíaca y, como consecuencia, aumenta el gasto cardíaco. La activación del receptor  $\beta_1$  también estimula la liberación de renina por parte del riñón. La activación de los receptores  $\beta_2$  por parte de la adrenalina relaja el músculo de fibra lisa en vasos y ocasiona vasodilatación (Harrison. Principios de medicina interna).

Un baroreflejo arterial es mediado por terminaciones nerviosas sensitivas, que son sensibles a la distensión, situadas en senos carotídeos y el cayado aórtico. La velocidad de activación de dichos barorreceptores aumenta con la presión arterial y el efecto neto es una disminución del flujo simpático, con lo cual disminuyen la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Éste es un mecanismo primario para equilibrar rápidamente las fluctuaciones agudas de la presión arterial que a veces surgen durante cambios posturales, estrés conductual o fisiológico y modificaciones del volumen sanguíneo. Sin embargo, la actividad del baroreflejo disminuye o se adapta a los incrementos sostenidos de la presión arterial, de manera que se reajusta la actividad de los barorreceptores, a presiones mayores (Harrison. Principios de medicina interna).



Hasta hace poco había unanimidad en que los barorreceptores tenían un papel clave de la regulación instantánea e incluso a corto plazo de la presión arterial, pero que no tenían un papel clave en la regulación a largo plazo por su capacidad de adaptarse a los cambios crónicos de presión y por su baja ganancia. Sin embargo, estudios recientes con denervación del seno aórtico han demostrado que el aumento de actividad simpático renal dependiente de los barorreceptores y sus efectos sobre la excreción renal de sodio es un fenómeno independiente del efecto simpático periférico y que parece tener un papel en el mantenimiento a largo plazo de la presión arterial (Lohemeier y cols., 2005). Una alteración crónica en el mecanismo de barorreceptores podría contribuir, junto con la ya descrita alteración en la función renal, al mantenimiento de una presión arterial crónicamente elevada y, como consecuencia, a la hipertensión (DiBona, 2004; López Novoa y López Hernández, 2006).

### **B) SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

Además de la capacidad de los riñones de controlar la presión arterial a través de los cambios de volumen del líquido extracelular, los riñones también tienen otro sistema modulador de la relación presión-natriuresis que sirve para controlar la presión arterial. Es el sistema renina angiotensina.

La renina es una enzima proteica liberada por los riñones cuando la presión arterial desciende demasiado. La renina se sintetiza y almacena en una forma inactiva conocida como prorenina en las células yuxtglomerulares de los riñones. Cuando desciende la presión arterial ocurre la escisión de muchas de las moléculas de prorenina de las células yuxtglomerulares y la liberación de renina, la mayor parte de la cual entra en la circulación sanguínea renal para circular después por todo el organismo. La renina actúa enzimáticamente sobre otra proteína plasmática, una globulina denominada sustrato de renina (o angiotensinógeno), para liberar un péptido de 10 aminoácidos, la angiotensina I, que tiene propiedades vasoconstrictoras no potentes, no suficientes para provocar cambios significativos en la función circulatoria.

Después de la formación de la angiotensina I se escinden otros 2 aminoácidos de esta angiotensina para formar el péptido de 8 aminoácidos llamado angiotensina II. Esta

conversión se produce casi en su totalidad en los pulmones y está catalizada por una enzima denominada enzima convertidora de angiotensina, que está presente en el endotelio de los vasos pulmonares (Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica).

La angiotensina II es una sustancia vasoconstrictora muy potente. Persiste en sangre sólo durante 1-2 minutos porque se inactiva rápidamente por muchas enzimas tisulares y sanguíneas que se conocen colectivamente como angiotensinasas. Durante su presencia en sangre la angiotensina II tiene dos efectos principales que pueden elevar la presión arterial:

- La vasoconstricción de muchas zonas del organismo que se produce rápidamente y es muy intensa en las arteriolas y mucho menor en las venas. El sistema vasoconstrictor renina-angiotensina requiere unos 20 minutos para estar totalmente activado, por lo que su control de la presión es algo más lento que el de los reflejos nerviosos y el sistema simpático noradrenalina-adrenalina
- El descenso de la excreción tanto de sal como de agua por los riñones, lo que aumenta lentamente el volumen del líquido extracelular, lo que después aumenta la presión arterial durante las horas y días sucesivos. Este efecto a largo plazo, que actúa a través del mecanismo de volumen del líquido extracelular, es más potente que el mecanismo vasoconstrictor agudo a la hora de aumentar finalmente la presión arterial. La angiotensina hace que los riñones retengan sal y agua de dos formas principalmente: por un lado actuando directamente en los riñones, concretamente sobre las células tubulares renales, para provocar la retención de sal y agua y por otro lado provocando la secreción de aldosterona de las glándulas suprarrenales. La aldosterona también aumenta la reabsorción de sal y agua en los túbulos renales.

Una de las funciones más importantes del sistema renina-angiotensina es permitir que la persona ingiera cantidades muy pequeñas o muy grandes de sal sin provocar grandes cambios del volumen de líquido extracelular ni de la presión arterial (Guyton and Hall. Tratado de Fisiología médica).

## SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

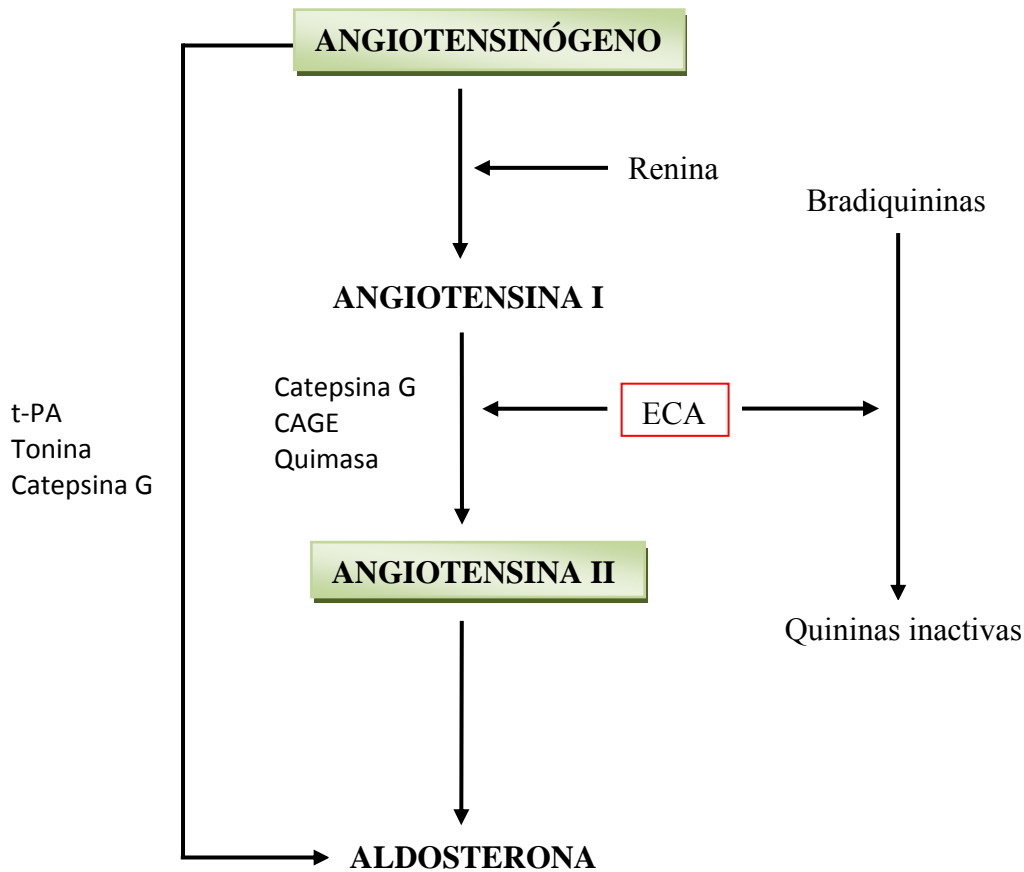


Figura 3. Esquema representativo del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

### C) MECANISMOS VASCULARES

El radio y la distensibilidad de arterias de resistencia también son determinantes en la presión arterial. La resistencia al flujo varía en sentido inverso a la cuarta potencia del radio y, en consecuencia, cualquier disminución pequeña en el calibre interior incrementa la resistencia en grado significativo. Hay que tener en cuenta que el aumento en las resistencias periféricas totales ocurre como consecuencia de los cambios en los lechos vasculares que ocurre en algunos órganos para autorregular su flujo sanguíneo debido al aumento del gasto cardíaco que existe en pacientes hipertensos, por lo tanto el aumento de las resistencias periféricas no es la consecuencia de que se produzca el

aumento de la presión arterial. En sujetos hipertensos, los cambios estructurales, mecánicos o funcionales pueden disminuir el diámetro interior de arterias finas y arteriolas. La remodelación consiste en las modificaciones geométricas de la pared del vaso sin cambios en su volumen interior; la de tipo hipertrófico (mayor número de células, incremento en su tamaño y un mayor depósito de matriz extracelular) o la de tipo eutrófico (ningún cambio en la cantidad de material en la pared del vaso) hacen que disminuya el calibre interior y de este modo contribuyen a una mayor resistencia periférica. También ayudan a la remodelación la apoptosis, la inflamación mínima y la fibrosis vascular. El diámetro interior también depende de la elasticidad del vaso. Los vasos con una mayor elasticidad pueden acomodar un volumen mayor con cambios relativamente pequeños de presión, en tanto que un sistema vascular semirrígido hace que cualquier incremento volumétrico, por pequeño que sea, induzca un incremento relativamente grande de la presión (Harrison. Principios de medicina interna).

El transporte de iones por las células de músculo de fibra lisa en vasos puede contribuir a las anomalías del tono y la proliferación en vasos, vinculadas con hipertensión, ambos factores modulados por pH intracelular.

La función del endotelio vascular también modula el tono en el vaso. El endotelio en ese sitio sintetiza y libera muy diversas sustancias vasoactivas, que incluyen el óxido nítrico, un vasodilatador potente.

No se sabe si las anomalías vasculares vinculadas con la hipertensión en el transporte de iones y la función endotelial son alteraciones primarias o consecuencias de la hipertensión. Lo que sí está comprobado es que los sujetos hipertensos por lo común muestran arterias más duras (Harrison. Principios de medicina interna).

Guyton también demostró que un aumento de las RPT de forma aislada no podía mantener la hipertensión a largo plazo si no se modifica la relación presión-natriuresis (Guyton, 1991). Asimismo, en ratas a las que se les induce hipertensión por la administración de acetato de deoxicorticosterona (DOCA), se demuestra que, aunque las RPT se mantengan en niveles normales mediante la administración crónica de un vasodilatador (minoxidil), las ratas acaban hipertensas (Huang y cols., 1992a). Lo mismo ocurre si las RPT se disminuyen mediante una fístula entre la aorta y la cava

abdominal practicada por debajo de las arterias renales (Huang y cols., 1992b; López Novoa y López Hernández, 2006).

La mayor parte de recientes experimentos hacen suponer un papel básico de las resistencias vasculares renales en control renal de la presión arterial. Esta hipótesis se basa en la suposición de que un aumento en las resistencias vasculares renales es un acontecimiento básico en la hipertensión de origen genético (Skov y Mulvany, 2004). Hay que recordar que las sustancias con efecto vasoconstrictor son hipertensoras, mientras que las sustancias vasodilatadores son hipotensoras, pero no (o, al menos, no solamente) por sus efectos sobre las RPT, sino por sus efectos sobre la circulación renal y la alteración de la curva presión-natriuresis (Mulvany, 1995; López Novoa y López Hernández, 2006).

Si aceptamos que los cambios en la excreción renal de sodio en función de los cambios de la presión de perfusión (presión arterial) representan, a través de los cambios en volumen extracelular y volumen sanguíneo, el mecanismo básico de control de la presión arterial y, por tanto, de génesis de la hipertensión cuando la función renal está alterada, ¿por qué aumentan las resistencias periféricas totales (RPT) en la hipertensión? La explicación más plausible para ello es la siguiente: un balance positivo de sodio y agua lleva consigo un aumento del volumen sanguíneo y, consecuentemente, un aumento de la presión venosa central; además, de acuerdo con la ley de Frank-Starling, se verifica un aumento de la contractilidad cardíaca y del gasto cardíaco y, por consiguiente, un aumento del aporte de sangre a los distintos órganos del cuerpo y de la presión arterial en condiciones de mantenimiento de las RPT. El principal determinante del flujo sanguíneo por los diferentes órganos es la tasa metabólica de cada órgano (fenómeno de autorregulación). Por ello, ante un aumento de la presión arterial y el consiguiente aumento del flujo sanguíneo por los diferentes órganos, aumentan las resistencias vasculares de los diferentes lechos vasculares de forma que la perfusión sanguínea vuelve a los niveles basales, aumentando así las resistencias periféricas totales. Debido a la reducción del flujo de sangre por los órganos, disminuye el retorno venoso, disminuye la presión venosa central y, consecuentemente, la contractilidad cardíaca y el gasto cardíaco. De esta manera, se pasa de una hipertensión de alto gasto cardíaco a una hipertensión de altas RPT (Guyton, 1989). De acuerdo con esto, los pacientes prehipertensos, o sea, aquellos genéticamente predispuestos a ser

hipertensos pero que todavía no tienen aumento de la presión arterial, suelen tener un aumento del gasto cardiaco con RPT normales, evolucionando, cuando ya son hipertensos, a un aumento de las RPT con disminución del gasto cardiaco (Ohlsson y cols., 1982), pasando la presión arterial a ser controlada fundamentalmente por el mecanismo de natriuresis de presión que permite ajustar el volumen sanguíneo y las RPT sin cambios en el gasto cardiaco. Inicialmente, el aumento en las RPT es puramente funcional (miogénica, nervioso hormonal), aunque posteriormente juega un papel fundamental en este aumento la remodelación estructural (Humphrey y cols., 2003; López Novoa y López Hernández, 2006).

Con todos estos datos se puede concluir que el aumento de la resistencia periférica total no eleva a largo plazo la presión arterial si no se modifican la ingestión de líquidos y la función renal. Teniendo en cuenta la ecuación básica de que la presión arterial es igual al gasto cardíaco por la resistencia periférica total, está claro que el aumento de la resistencia periférica total debería elevar la presión arterial. En realidad, la presión arterial aumenta inmediatamente cuando la resistencia periférica total aumenta de forma aguda. En este momento, la elevación aguda de la presión arterial no se mantiene si los riñones continúan funcionando normalmente, por el contrario retorna a la normalidad en un día, más o menos.

### **1.6. CONSECUENCIAS PATOLÓGICAS DE LA HIPERTENSIÓN**

La hipertensión es un factor de riesgo muy importante de patologías cardiovasculares. Las consecuencias patológicas de la hipertensión se observan principalmente en cuatro tejidos: corazón, cerebro, riñón y aorta. Constituye un factor independiente que predispone a la insuficiencia cardiaca, a la arteriopatía coronaria, al accidente vascular cerebral, a neuropatías y a arteriopatías periféricas. La hipertensión se asocia a una alta mortalidad y está claramente demostrado que los efectivos tratamientos que disminuyen la presión arterial a niveles normales bajan esta alta mortalidad.

Los principales daños que produce la hipertensión son como consecuencia de daños en la vasculatura de los órganos y tejidos.

### a) Corazón:

Las enfermedades del corazón o cardiopatías constituyen la causa más frecuente de muerte en hipertensos. Las cardiopatías por hipertensión son consecuencia de adaptaciones estructurales y funcionales que culminan en hipertrofia del ventrículo izquierdo, disfunción diastólica, anomalías del flujo de sangre por ataque aterosclerótico de arterias coronarias y enfermedad microvascular en ellas y arritmias.

Los factores genéticos y hemodinámicos contribuyen a la hipertrofia de ventrículo izquierdo. Las personas con hipertrofia en este ventrículo están expuestas a un mayor peligro, por ejemplo, de accidente vascular cerebral y a muerte repentina. El control intensivo de la hipertensión permite la regresión o reversión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo y aminora el peligro de enfermedades cardiovasculares.

Las anomalías de la función diastólica que varían desde la cardiopatía asintomática hasta la insuficiencia cardíaca manifiesta, son frecuentes en hipertensos. La disfunción diastólica es consecuencia temprana de alguna cardiopatía por hipertensión y es exacerbada por hipertrofia e isquemia de ventrículo izquierdo (Harrison. Principios de medicina interna).

### b) Encéfalo:

La hipertensión es un factor importante de riesgo de infarto y hemorragia del encéfalo. En promedio, el 85% de los accidentes vasculares cerebrales provienen de infarto y el resto, de hemorragia, sea intracerebral o subaracnoidea. La incidencia de accidente vascular cerebral aumenta de manera progresiva conforme lo hacen los niveles de la presión arterial, en particular la sistólica en sujetos mayores de 65 años.

La hipertensión también se acompaña de deficiencias en la esfera cognitiva en la población de ancianos y existe un vínculo entre la hipertensión en la etapa media de la vida y el deterioro en dicha esfera en el tramo final de la existencia.

El flujo sanguíneo cerebral no cambia en un rango muy amplio de presiones arteriales gracias a un proceso llamado autorregulación de dicho flujo. En sujetos con el síndrome clínico de hipertensión maligna, la encefalopatía depende de la ineficacia de la autorregulación de la corriente cerebral, de lo cual surgen vasodilatación y exceso de riego (hiperperfusión). La hipertensión maligna es una hipertensión arterial sistémica rápidamente progresiva, caracterizada por una arteritis necrosante con degeneración fibrinoide y, clínicamente, por PA muy elevada, hemorragias, exudados retinianos y, frecuentemente, edema de papila. Ocurre en el 1% de los pacientes con hipertensión arterial sistémica, es más frecuente en varones y raza negra.

Es importante diferenciar entre la encefalopatía por hipertensión y otros síndromes neurológicos que a veces se acompañan de esta última como isquemia cerebral, accidente hemorrágico o trombótico, cuadros convulsivos, hipertensión intracraneal, delirium tremens, meningitis, encefalopatía urémica, etc (Harrison. Principios de medicina interna).

### c) Riñones:

La nefropatía primaria constituye la causa más frecuente de hipertensión secundaria. Por el contrario, la hipertensión constituye un factor de peligro de lesión renal y de enfermedad renal en estadio terminal. El peligro para los riñones al parecer guarda relación más íntima con la presión sistólica que con la diastólica, y los varones de raza negra están expuestos a un mayor peligro que los de raza blanca, a presentar enfermedad renal en estadio terminal en todos los niveles de la presión arterial.

Las lesiones vasculares ateroscleróticas en el riñón vinculadas con la hipertensión afectan predominantemente a las arteriolas preglomerulares, de lo cual surgen cambios isquémicos en los glomérulos y estructuras postglomerulares. La lesión glomerular puede ser consecuencia de daño directo a los capilares del glomérulo por deficiencias de riego a él. Las alteraciones glomerulares evolucionan hasta la forma de glomeruloesclerosis y al final los túbulos renales pueden mostrar isquemia y poco a poco atrofia. La lesión renal que acompaña a la hipertensión maligna consiste en la necrosis fibrinoide de las arteriolas aferentes, que a veces se extiende al interior del



glomérulo y puede originar necrosis focal del ovillo glomerular (Harrison. Principios de medicina interna).

### d) Arterias periféricas:

Los vasos sanguíneos, además de contribuir a la patogenia de la hipertensión, pueden ser el destino en el que se localice la enfermedad aterosclerótica que surja como consecuencia de varios años de hipertensión. Se puede producir una aterosclerosis progresiva de grandes vasos, en especial de vasos cerebrales, aorta, coronarias y arterias de los miembros inferiores, generando hipoperfusión crónica subclínica o sintomática. Los hipertensos con arteriopatías de extremidades pélvicas están expuestos a un mayor peligro futuro de enfermedades cardiovasculares (Harrison. Principios de medicina interna).

### e) Ojos:

La retinopatía hipertensiva es un daño en la retina como consecuencia de la hipertensión arterial. En la hipertensión arterial, tanto esencial como secundaria, se afecta precozmente la retina y se observaron alteraciones en el fondo de ojo denominadas clásicamente retinopatía hipertensiva. Aunque parece haber una asociación clara entre las alteraciones retinianas y el aumento de las cifras tensionales medias, parece que existen otros factores asociados a la retinopatía como arteriosclerosis, edad avanzada, enfermedades de la arteria carótida, etc. La prevalencia de retinopatía en pacientes hipertensos, una vez excluidas otras causas como diabetes, oscila entre el 7,8 y 11% según autores.

Aunque al conjunto de cambios en el fondo de ojo se le ha venido denominando retinopatía hipertensiva, se ha demostrado que estos cambios se deben a tres tipos de manifestaciones independientes: retinopatía hipertensiva. coroidopatía hipertensiva y neuropatía óptica hipertensiva. Estos tres cuadros se deben a que los vasos retinianos, coroideos y de la cabeza del nervio óptico, por sus diferencias anatómicas y fisiológicas, responden de distinta forma a las elevaciones de la tensión arterial.

Hay varios aspectos condicionantes en la retinopatía hipertensiva: la gravedad de la hipertensión, que se refleja en el grado de retinopatía y en los cambios vasculares que origina; la duración, que también se refleja en el grado de retinopatía y en los cambios vasculares escleróticos, aunque no parece influir en la prevalencia de los mismos; la rapidez de la instauración de la hipertensión; el estado previo del árbol vascular retiniano (Trisán Anoro y cols., 2000).

### **1.7. DIAGNÓSTICO DE LA HIPERTENSIÓN Y MONITORIZACIÓN:**

El método actual para el diagnóstico de la hipertensión es mediante el esfigmomanómetro. Este método tiene muchas carencias ya que se trata solamente de una medida puntual de la presión arterial, que aunque se tome en repetidas ocasiones, no sirve para monitorizar la evolución de la presión arterial. Para esto existe la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) pero este método solo se utiliza en pacientes hipertensos de difícil control como por ejemplo, en pacientes resistentes a medicamentos antihipertensivos o para evaluar la medicación en pacientes hipertensos de alto riesgo cardiovascular. Todo esto hace necesario la aparición de nuevas técnicas para un diagnóstico más fiable de la hipertensión, y lo que es más importante, para monitorizar su evolución y la de los daños que ocurren en los diversos órganos como consecuencia de esta enfermedad.

La esfigmomanometría es un procedimiento no invasivo, cuya finalidad es la medición indirecta de la presión arterial mediante un esfigmomanómetro que es el instrumento clásico empleado para esta medición. El esfigmomanómetro puede ser de varios tipos: los tradicionales son de columna de mercurio, los aneroides (de aguja en un dial circular) y los digitales. Aún se utiliza la terminología introducida por Korotkoff: la PA sistólica se reconoce cuando se escuchan sonidos claros y repetitivos de golpeteo; la PA diastólica se registra cuando desaparecen estos sonidos.



**Figura 4.** Tipos de esfigmomanómetros: de izquierda a derecha, esfigmomanómetro mercurial, aneroides y digital.

Para una correcta medición de la PA existen unos principios generales:

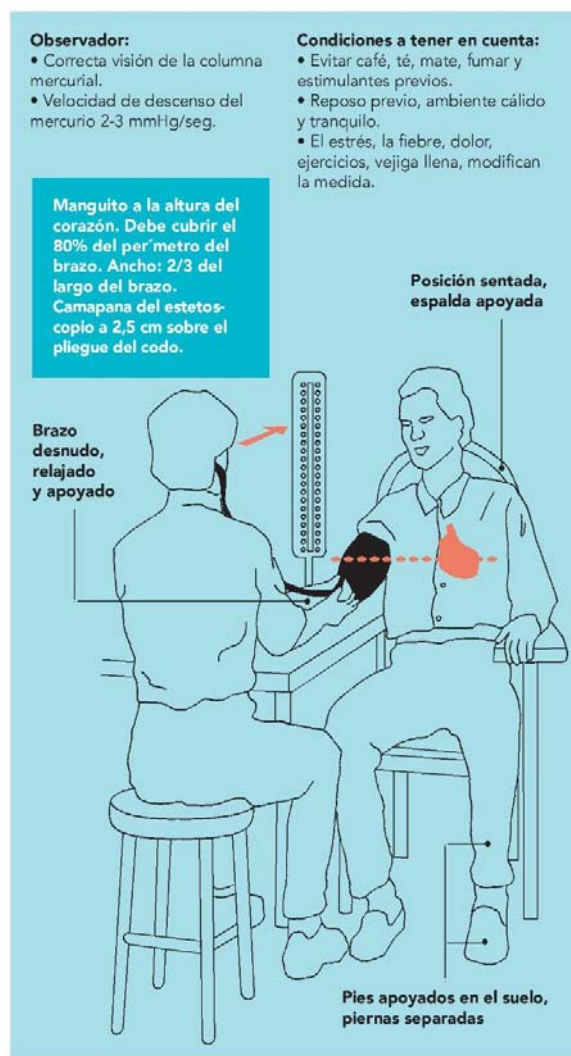
- Es necesario usar un manguito con tamaño adecuado al perímetro del brazo del paciente, ya que los pacientes obesos precisan, si la circunferencia de su brazo es superior a 32 cm, un manguito de mayor longitud (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007). La velocidad de caída de la columna de mercurio (deshinchamiento del manguito) debe ser de 2 a 3 mm Hg/s (El corazón. Manual De Cardiología).
- Es necesario realizar mediciones múltiples en ocasiones diferentes antes de decidir si es necesario reducir la PA de un paciente.

Las mediciones de la PA presentan una gran variabilidad intrínseca. Para reducir al mínimo esta variabilidad se pueden seguir varios pasos, que consisten en lo siguiente:

- Debe realizarse idealmente en decúbito supino y en sedestación.
- Se realizan dos o más determinaciones en cada posición separadas unos minutos.
- La lectura de la presión arterial en bipedestación es recomendable también en pacientes ancianos y en aquellos tratados con diuréticos o con vasodilatadores.
- En los pacientes con neuropatía autónoma la presión debe determinarse también en bipedestación, después de 1 min de incorporarse, para descartar

la presencia de hipotensión postural (descenso superior a 20 mmHg en la presión sistólica) (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

- Realizar mediciones múltiples, especialmente cuando el pulso es irregular.
- Centrar la bolsa del manguito sobre la arteria braquial, con su borde inferior a menos de 2,5 cm de la fosa antecubital. El paciente debe permanecer en silencio, colocado cómodamente (en una silla con respaldo en caso de estar sentado), durante al menos 5 minutos antes de la medición.
- El paciente no debe haber tomado bebidas alcohólicas o con cafeína, ni tampoco debe haber fumado, durante los 30 minutos previos a la medición de la PA.
- La PA se debe medir en pacientes que no presenten repleción del recto o la vejiga. El brazo debe estar apoyado a una altura similar a la del corazón.
- Colocar la campana del estetoscopio sobre la arteria braquial, ejerciendo la menor presión posible sobre la piel del paciente. Inflar el manguito hasta 20 mm Hg por encima de la presión a la que desaparece el pulso palpable de la arteria radial. Utilizar un esfigmomanómetro bien calibrado.
- Tratar de evitar la “preferencia por el dígito terminal” (más del 20% de las mediciones que finalizan con un mismo dígito específico).
- Inicialmente, la PA se debe medir en ambos brazos y, cuando la diferencia entre las dos mediciones es superior a 10/5 mm Hg, se debe volver a medir en el brazo con mayor PA (El corazón. Manual De Cardiología).



**Figura 5.** Dibujo donde se puede observar todas las condiciones a tener en cuenta para una correcta medida de la presión arterial.

Fuente: [http://www.dfarmacia.com/farma/ctl\\_servlet?\\_f=13&idContenido=13148967&idCategoria=4](http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=13&idContenido=13148967&idCategoria=4)

La determinación de la presión arterial tiene limitaciones debidas a reproductibilidad, a la necesidad del reposo previo y en particular a la existencia de pacientes cuya presión arterial se incrementa en la consulta médica dando lugar a lo que se conoce como “fenómeno de bata blanca”. Este fenómeno ocurre hasta en un 20-25% de los adultos y en un 50-60% de los niños y adolescentes” (Pickering y cols., 1988) y el tratamiento farmacológico en estos casos no parece aportar ningún beneficio desde el punto de vista del riesgo cardiovascular, por lo que es conveniente su detección para evitar tratamientos innecesarios (Khattar y cols., 1998).

Otro aspecto a tener en cuenta es que la presión arterial mantiene un ritmo circadiano fisiológico con una disminución o dipping de los valores durante el período

de descanso nocturno (Ingelfinger, 2002). Los pacientes con diabetes mellitus presentan con más frecuencia que el resto de la población una ausencia del descenso fisiológico nocturno de la presión arterial (Gilbert y cols., 1994; Wiegmann y cols., 1990), también conocida como patron non-dipping, y que se ha asociado a un aumento del riesgo cardiovascular (Sturrock y cols., 2000). La determinación del ritmo circadiano se realiza mediante la MAPA durante 24 horas en las que se registra de forma automatizada la presión arterial a intervalos variables (habitualmente cada 15-30 minutos de día y cada 30-60 minutos de noche) mientras el paciente realiza su actividad normal. Esta técnica permite además salvar algunos de los inconvenientes más importantes de la determinación convencional de la presión arterial, como el fenómeno de bata blanca. La MAPA presenta limitaciones, ya que además de ser más incómoda para el paciente y más laboriosa para el profesional, desde el punto de vista metodológico no existe una estandarización aceptada internacionalmente sobre aspectos fundamentales, como la definición de normo e hipertensión, del descenso tensional fisiológico nocturno (dipping) o de los intervalos de tiempo que deben utilizarse. A pesar de estas limitaciones, la MAPA es una herramienta de un gran valor en la evaluación de la HTA en el paciente con diabetes.

Para resumir, existen tres formas distintas de toma de la medida de la presión arterial que son:

- 1) Determinación de la presión arterial en la consulta o en la clínica. Es la realizada por personal sanitario.
- 2) Determinación de la presión arterial domiciliaria (AMPA). Es la que efectúa el propio paciente en su domicilio, definida también como automedida. Evitan la hipertensión de “bata blanca”. Es aconsejable rechazar la primera medida para evitar la reacción de alerta y se deben promediar los valores de PA de la segunda y tercera medida, separadas por un intervalo de tres minutos.
- 3) Monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) (Nefrología clínica. Editorial Médica Panamericana. 2004).

## 1.8. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN

El tratamiento de la hipertensión no siempre es efectivo. Varias pueden ser las causas, como por ejemplo la mala elección de los medicamentos, pacientes que no responden a ningún tratamiento o pacientes que no cumplen las pautas de tomas de los medicamentos. Otro gran problema de los tratamientos actuales es que solo disminuyen los valores de presión arterial pero no eliminan el problema definitivamente, es decir, sin la ayuda de estos medicamentos la presión arterial volvería a aumentar, teniendo que tomar los pacientes hipertensos medicación a lo largo de toda su vida. Todo esto hace muy necesario seguir estudiando en profundidad esta enfermedad para poder desarrollar nuevos fármacos en un futuro que sean apropiados para cada tipo de paciente.

A pesar de los avances terapéuticos de las últimas décadas en el tratamiento de la hipertensión arterial y de sus principales consecuencias, como la enfermedad cardiovascular y renal, la morbimortalidad por estas afecciones continúa siendo muy elevada (Mazón Ramos y González Juanatey, 2009).

El tratamiento de la hipertensión es farmacológico, aunque el estilo de vida también influye en el control de la presión arterial, lo que podemos denominar en conjunto como “tratamiento no farmacológico”.

Existen 5 clases principales de fármacos para el tratamiento de la HTA: diuréticos, betabloqueantes, calcioantagonistas, IECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) y ARAII (antagonista de los recetores de la angiotensina II). Además, se dispone de alfabloqueantes, de fármacos de acción central y de vasodilatadores arteriales directos (Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial SEH-LELHA, 2002; Kaplan, 1998). Otros fármacos están apareciendo en la actualidad como inhibidores directos de la renina.

Desde hace más de una década existe una clasificación histórica de los agentes antihipertensivos que los divide en fármacos clásicos (fundamentalmente diuréticos y betabloqueantes) y fármacos recientes o modernos (calcioantagonistas, IECA y ARAII) (Pedro Armario y *cols.*, 2005).

En el corto plazo de tiempo en el que suelen desarrollarse los ensayos clínicos, no existen diferencias fundamentales en el pronóstico del paciente hipertenso por el hecho de recibir un tipo u otro de fármaco antihipertensivo (Staessen y cols., 2001, 2003). A pesar de este hecho, existe un debate acerca de qué grupo de fármacos ha de considerarse como primera elección en el tratamiento de la HTA. Este debate no debe restar atención a dos hechos trascendentales en el tratamiento antihipertensivo. Por un lado, el beneficio del tratamiento se asocia fundamentalmente con el descenso de la PA y, por otro, que para conseguir una reducción adecuada de la PA es necesaria la asociación de más de un fármaco antihipertensivo en la mayoría de los pacientes.

El tratamiento antihipertensivo se entiende en la actualidad como parte del manejo integral del riesgo cardiovascular, siendo necesaria con frecuencia la asociación de otras terapias encaminadas a reducir el riesgo cardiovascular añadido de cada paciente (Armario y cols., 2005).

### **1.8.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

#### a) Diuréticos:

Los diuréticos son los fármacos antihipertensivos más antiguos y siguen siendo uno de los grupos de mayor utilidad. Son eficaces, económicos y generalmente bien tolerados a dosis bajas. Los diuréticos son fármacos básicos en el manejo de la insuficiencia cardíaca. En los ensayos clínicos clásicos se demostró la eficacia de los diuréticos en la prevención de las complicaciones cardiovasculares del paciente hipertenso. Los diuréticos tiazídicos están especialmente indicados en el tratamiento de la HTA sistólica aislada del anciano. Los pacientes mayores con HTA sistólica aislada y diabetes obtienen un beneficio especial con este tipo de tratamiento (Curb y cols., 1996).

En la mayoría de los ensayos clínicos publicados en los últimos años se ha evaluado la relación entre el tratamiento antihipertensivo y la aparición de nuevos casos de diabetes y se ha descrito que los pacientes que reciben tratamientos clásicos presentan un riesgo añadido de desarrollar esta complicación. Las consecuencias a largo plazo de este fenómeno no son bien conocidas, pero algunos trabajos han demostrado



que podrían ocasionar un efecto deletéreo (Verdecchia y cols., 2004; Dunder y cols., 2003; Lindholm y cols., 2003; Pepine y Cooper-DeHoff, 2004).

### b) Betabloqueantes:

Los betabloqueantes son fármacos seguros, eficaces y económicos. Las indicaciones especiales de estos fármacos son las distintas formas clínicas de la cardiopatía isquémica y determinadas arritmias. La insuficiencia cardíaca se ha considerado una contraindicación clásica del tratamiento betabloqueante. Sin embargo, en varios ensayos clínicos realizados recientemente se ha demostrado la utilidad de la asociación de betabloqueantes al tratamiento básico con diuréticos, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) y digoxina.

Como se ha comentado en el apartado de los diuréticos, se ha descrito un aumento del riesgo de desarrollo de diabetes asociado con el uso de betabloqueantes con respecto al observado cuando el tratamiento antihipertensivo se basa en fármacos modernos (Lindholm y cols., 2003; Pepine y Cooper-DeHoff, 2004).

### c) Calcioantagonistas:

Todos los subgrupos de calcioantagonistas son eficaces y bien tolerados como fármacos antihipertensivos. Es recomendable el uso de sustancias de acción prolongada evitando el empleo de fármacos de acción rápida y corta. Las dihidropiridinas de acción prolongada son eficaces en pacientes de edad avanzada con HTA sistólica. Al igual que se ha comentado para los diuréticos, los pacientes mayores con HTA sistólica y diabetes obtienen un beneficio especial al recibir este tipo de tratamiento (Staessen y cols., 1997; Tuomilehto y cols., 1999). Varios estudios han demostrado que los calcioantagonistas presentan una especial capacidad antiaterosclerótica con respecto al tratamiento con fármacos clásicos (Borhani y cols., 1996; Zanchetti y cols., 1998; Simon y cols., 2001; Zanchetti y cols., 2002).

### d) Inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina:

Los IECA son fármacos seguros y ofrecen una prevención cardiovascular primaria similar a los fármacos clásicos en el paciente hipertenso y probablemente superior en casos con HTA y diabetes y en pacientes hipertensos de edad avanzada (Hansson y *cols.*, 1999; Scherstén y *cols.*, 1999; Wing y *cols.*, 2003). En pacientes de alto riesgo cardiovascular, mayores de 55 años con antecedentes de episodios cardiovasculares o diabéticos con algún factor de riesgo añadido, los IECA disminuyen la morbimortalidad cardiovascular y total incluso en ausencia de HTA (Bosch y *cols.*, 2002). Resultados similares se han comunicado en pacientes con antecedentes de enfermedad cerebrovascular o cardiopatía isquémica (Fox, 2003).

Los IECA ofrecen una nefroprotección especial al ser eficaces en la prevención de la nefropatía diabética, ya sea secundaria a diabetes tipo 1 como a diabetes tipo 2, y en diferir la progresión de la insuficiencia renal de etiología no diabética (Ruggenenti y *cols.*, 2004).

Los IECA son el tratamiento básico de la insuficiencia cardíaca y presentan una especial eficacia en la prevención secundaria tras un infarto de miocardio, sobre todo en casos de disfunción ventricular (López-Sendón y *cols.*, 2004).

Uno de los problemas para la administración de este fármaco es que puede producir tos seca en el paciente.

### e) Antagonista de los receptores de la angiotensina II:

Los ARAII tienen muchas características comunes con los IECA, pero poseen una mejor tolerabilidad (Burnier y Brunner, 2000; Tamargo, 2000; Gorostidi y *cols.*, 2002). Durante los primeros años de uso de estos fármacos en la práctica clínica la principal indicación fue la sustitución de un tratamiento con IECA no tolerado por tos (World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension, 1999). Sin embargo, se han publicado numerosos ensayos clínicos en los que se demuestra que los ARAII tienen un papel propio como fármacos antihipertensivos de primera línea.

El tratamiento con ARAII en pacientes con HTA e hipertrofia ventricular izquierda ha demostrado ofrecer una protección cardiovascular superior al tratamiento con betabloqueantes, especialmente en casos con diabetes (Lindholm y cols., 2002). Este beneficio se obtuvo fundamentalmente por una reducción del riesgo de ictus. En pacientes con HTA sistólica aislada y en casos de edad avanzada también se han observado ventajas con el uso de ARAII en comparación con tratamientos basados en fármacos clásicos (Lithell y cols., 2003).

La eficacia nefroprotectora de los ARAII se ha comprobado en estudios recientes sobre la prevención de la nefropatía asociada a la diabetes tipo 2 (Viberti y Wheeldon, 2002). Basándose en dichos estudios, la ADA (American Diabetes Association) estableció que los ARAII deben ser agentes de primera elección en enfermos hipertensos con diabetes tipo 2 que tengan insuficiencia renal y proteinuria (American Diabetes Association, 2005).

### f) Alfabloqueantes:

Las indicaciones clásicas del tratamiento antihipertensivo con alfabloqueantes son las asociaciones de HTA con hipertrofia benigna de próstata y de HTA con dislipidemia (European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee, 2003). La utilidad de los alfabloqueantes como tratamiento antihipertensivo de primer escalón ha sido objeto de debate tras la polémica suspensión precoz del grupo de pacientes que recibían doxazosina en el estudio ALLHAT (The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial) por presentar una incidencia de insuficiencia cardíaca superior a la observada en el grupo control que recibía clortalidona (The ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2000). La mayoría de las guías actuales establecen que la indicación fundamental de los alfabloqueantes es la terapia de combinación con otros fármacos (Armario y cols., 2005).

### g) Inhibidores directos de la renina:

La introducción del grupo de fármacos inhibidores de la actividad de la renina, entre los cuales se encuentra el aliskiren, marca el inicio de una nueva era en el enfoque

terapéutico de la hipertensión arterial. Se trata de una nueva clase farmacológica que actúa bloqueando el sistema renina-angiotensina-aldosterona en su inicio, como inhibidor directo de la renina. Este nuevo compuesto ha mostrado una importante eficacia antihipertensiva y es seguro y bien tolerado por los pacientes (Mazón Ramos y González Juanatey, 2009). Se ha demostrado que el aliskiren ofrece una potente reducción de la presión arterial que se prolonga más allá de las 24 h, tanto en monoterapia como en terapia combinada con diuréticos tiacídicos o antagonistas del calcio dihidropiridínicos. La magnitud de la reducción de la PA es similar a la observada con los antihipertensivos disponibles cuando se utilizan a dosis equipotentes y su tolerabilidad es similar a la del placebo. El potencial papel terapéutico del aliskiren, como alternativa a cualquier monoterapia o combinado con otros antihipertensivos, abre una nueva expectativa para el tratamiento y el control de la hipertensión arterial, así como para una más eficiente protección orgánica (Coca y cols., 2009).

### h) Otros fármacos antihipertensivos:

En la actualidad se dispone de varios fármacos de acción central. Entre los más antiguos figuran la clonidina y la alfametildopa. Esta última sustancia sigue siendo el tratamiento de elección para la HTA en el embarazo. En los últimos años se ha incorporado al uso clínico un estimulador de los receptores imidazolínicos, la moxonidina, que presenta una mejor tolerabilidad.

Los fármacos vasodilatadores arteriales clásicos, hidralacina y minoxidil, siguen disponibles y son útiles en asociaciones múltiples. El minoxidil es una de las sustancias antihipertensivas más potentes asociado a diuréticos y betabloqueantes, aunque tiene muchos efectos secundarios como retención hidrosalina, taquicardia e hipertriosis (Armario y cols., 2005).

### i) Tratamiento farmacológico combinado:

En los estudios de efectividad antihipertensiva, habitualmente llevados a cabo en pacientes hipertensos sin o con escasa repercusión orgánica, se comunican unas tasas de control con monoterapia que no se suelen corresponder con las conseguidas en la práctica clínica o con las observadas en los ensayos clínicos de morbimortalidad con

pacientes de mayor riesgo. La monoterapia controla tan sólo a un 30%-50% de los pacientes con HTA, por lo que en la mayoría de los casos será preciso utilizar asociaciones. En pacientes de alto o muy alto riesgo cardiovascular derivado de presentar diabetes de larga evolución, enfermedad renal u otra enfermedad vascular establecida puede llegar a ser necesario utilizar más de dos fármacos en aproximadamente un 25% de los casos. El tratamiento farmacológico combinado produce reducciones de la PA superiores a las obtenidas con cualquiera de los grupos de fármacos utilizados de forma aislada (Armario y cols., 2005).

- j) Otros tratamientos farmacológicos útiles en la reducción del riesgo cardiovascular:

El objetivo principal del tratamiento del paciente hipertenso es la reducción del riesgo cardiovascular total. La parte principal de este tratamiento será la reducción de las cifras de PA, pero en muchas ocasiones hay que controlar otros factores de riesgo. El médico debe instaurar una pauta de tratamiento integral que incluya, según sea preciso, tratamiento hipoglucemiante, hipolipemiante o antiagregante plaquetario (Armario y cols., 2005).

### **1.8.2. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO DE LA PRESIÓN ARTERIAL**

Las medidas no farmacológicas dirigidas a cambiar el estilo de vida deben ser instauradas en todos los hipertensos o individuos con PA normal alta, bien sea como tratamiento de inicio (riesgo añadido bajo-moderado), bien complementando el tratamiento farmacológico antihipertensivo. El propósito de dichas medidas es reducir la PA y prevenir el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Algunos tratamientos no farmacológicos son: reducción de peso, reducción del consumo de sal, reducción del consumo excesivo de alcohol, aumento de la actividad física y abandono del tabaco (Armario y cols., 2005).

## 2. DIABETES MELLITUS

### **2.1. NOTAS HISTÓRICAS DE LA DIABETES MELLITUS**

En 1868 el egiptólogo alemán Ebers descubrió un famoso papiro egipcio escrito en el 1500 a.C. en el que se reflejaba todo lo que se creía saber de la Medicina de aquellos tiempos. En un párrafo se habla de una extraña enfermedad que hace adelgazar a los enfermos, quienes tienen hambre permanente, orinan abundantemente, y están atormentados por una enorme sed. Esta enfermedad muchos siglos después recibió el nombre griego de “diabetes”. Concretamente, en el siglo III a.C. Apolonio de Menfis dio a esta enfermedad el nombre de diabetes, que significa “pasar a través de”, que se podría interpretar como el efecto que hace el agua que bebe el diabético y que elimina en la misma forma que la bebe (Rodríguez, 1992).

En la India, en el libro de Ayur Veda Suruta (400 a.C.) se escribió la primera referencia al sabor dulce de la orina. En dicho libro se describe una enfermedad característica de las personas pudientes, obesas, que comen mucho dulce y cuya característica sobresaliente y peculiar es que su orina tiene un olor y sabor dulzón. Willis (1622) probó la orina de un diabético e insistió nuevamente, como ocurrió en otras ocasiones a lo largo de la historia, en que la orina de estos pacientes era dulce. Años más tarde, Mathew Dobson en 1775 descubrió que el sabor dulce era por la presencia de azúcar en la orina. Otro importante avance fue el protagonizado a mediados del siglo XIX cuando Claudio Bernard demostró que el aumento de la glucosa en la sangre era el signo más significativo de la diabetes y describió también el importante papel del hígado en el metabolismo de la glucosa. En 1867, Langerhans descubre en el páncreas de un mono unos islotes dispersos de células, con una estructura distinta de las células que producen los fermentos digestivos, cuya función es desconocida. En 1889 Joseph Von Mering y Oscar Minkowsky concluyen que la extirpación del páncreas produce una diabetes de curso grave que termina con el fallecimiento en pocas semanas. A partir de este punto, centran sus investigaciones en la sustancia que producen los islotes de Langerhans, que llamarán Insulina o Isletina. Otro descubrimiento ocurrió en el año 1921, cuando Frederick G. Banting y su ayudante

Charles H. Best obtuvieron un líquido que, inyectado en una cachorra diabética, conseguía reducir en dos horas una glucemia, lo que significa el descubrimiento de la insulina. Esta cachorra fue el primer animal que después de haberle quitado el páncreas, pudo vivir varias semanas con la inyección del extracto de Banting y Best.

Hoy en día la hiperglucemia sigue siendo el marcador inequívoco de la existencia de diabetes aunque en ésta se produce una amplia alteración de todo el metabolismo intermediario.

### **2.2. DEFINICIÓN**

La diabetes mellitus (DM) se puede definir como un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia producida por defectos en la secreción de insulina, en su acción o en ambas. La hiperglucemia crónica de la DM se asocia a largo plazo con la disfunción y el fallo de varios órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los grandes vasos (American Diabetes Association, 2006). La DM engloba un conjunto heterogéneo de síndromes hiperglucémicos con características genofenotípicas diferentes y con múltiples factores que intervienen en su etiopatogenia. Puede existir una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas con déficit absoluto de la insulina, o bien intervenir agentes que condicionan una resistencia a la acción de la insulina que disminuye la respuesta de los tejidos a la acción de esta hormona. En un mismo paciente puede coexistir defecto de secreción y de la acción insulínica.

### **2.3. CLASIFICACIÓN**

Se han hecho diversos intentos de clasificación de la DM, pero en la actualidad se sigue conservando la propuesta de la ADA, que se basa en una clasificación etiológica (American Diabetes Association, 2003).

### **Diabetes tipo 1:**

La diabetes tipo 1 se produce como consecuencia de la destrucción de la célula  $\beta$ , generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Dentro de este tipo existe la DM tipo 1 autoinmune y la idiopática:

a) Autoinmune: se da en un 5-10% de todos los diabéticos y ocurre como consecuencia de una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas. Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) son los determinantes de la DM1A, fundamentalmente los alelos HLA DQ y DR. Existe pues una predisposición genética para el desarrollo de este tipo de diabetes pero también está relacionada con factores ambientales no bien definidos. Aunque la DM1A suele comenzar en la infancia o juventud, puede darse a cualquier edad de la vida (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

b) Idiopática: no se conoce la causa, no se encuentra autoinmunidad ni ninguna asociación con CMH. Tiene fuerte penetrancia hereditaria y preferencia por grupos étnicos especiales (asiáticos y afroamericanos). Es de evolución variable desde un comienzo agudo por cetoacidosis y coma hasta la remisión completa. Tiene menor prevalencia de complicaciones macro y microvasculares y neuropáticas (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### **Diabetes tipo 2:**

El factor causante predominante puede ser la insulinoresistencia, la alteración en la secreción de insulina o ambas.

Constituye el 90-95% de todas las diabetes. Es un síndrome hiperglucémico heterogéneo genofenotípicamente que se acompaña con frecuencia de obesidad (abdominal) y que puede permanecer sin diagnosticar durante años. Tiene una fuerte predisposición genética causada por un genotipo complejo cuya expresión es regulada por factores externos (nutrición, actividad física, etnia, malnutrición intrauterina y otros). La prevalencia de complicaciones macro y microvasculares y neuropatía en DM2 es precoz.



La DM2 tiene un alto riesgo de enfermedad vascular aterogénica justificado sobre todo por la asociación habitual con otras alteraciones metabólicas, como obesidad visceral, dislipidemia, hiperuricemia, hipertensión arterial, etc. (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### **Otros tipos específicos:**

#### **a) Genéticos:**

- Defectos genéticos de la función de la célula  $\beta$ : existe una alteración de la secreción de insulina pero con pocos defectos en su acción. Se han descrito diversas formas de diabetes asociadas con defectos monogénicos en la célula  $\beta$ .
- Defectos genéticos de la acción de la insulina: se han descrito mutaciones del receptor de insulina que pueden cursar con hiperinsulinemia e hiperglucemia leve o incluso con diabetes importante. También existe una situación de extrema resistencia a la insulina denominada “diabetes lipoatrófica” en la cual no se han podido demostrar alteraciones en la estructura y función del receptor de insulina, interpretándose que las lesiones se sitúan postreceptor.
- Otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados a diabetes: la mayoría muestran diferentes mecanismos de producción y espectro evolutivo muy variable del trastorno hidrocarbonado, que puede variar entre muy moderada intolerancia hidrocarbonada a franca diabetes.

#### **b) No genéticos:**

- Enfermedad del páncreas exocrino: en casos de pancreatitis, carcinoma pancreático, postpancreatectomía, infecciones y traumas, se produce una alteración extensa del páncreas que puede conducir a diabetes.
- Endocrinopatías: varias hormonas son antagonistas de la insulina como, por ejemplo, el cortisol, el glucagón y la adrenalina. Una excesiva producción

puede inducir diabetes, como se puede comprobar en la acromegalia, el glucagonoma o el feocromocitoma. La diabetes en estos casos generalmente es reversible cuando revierte el proceso causante.

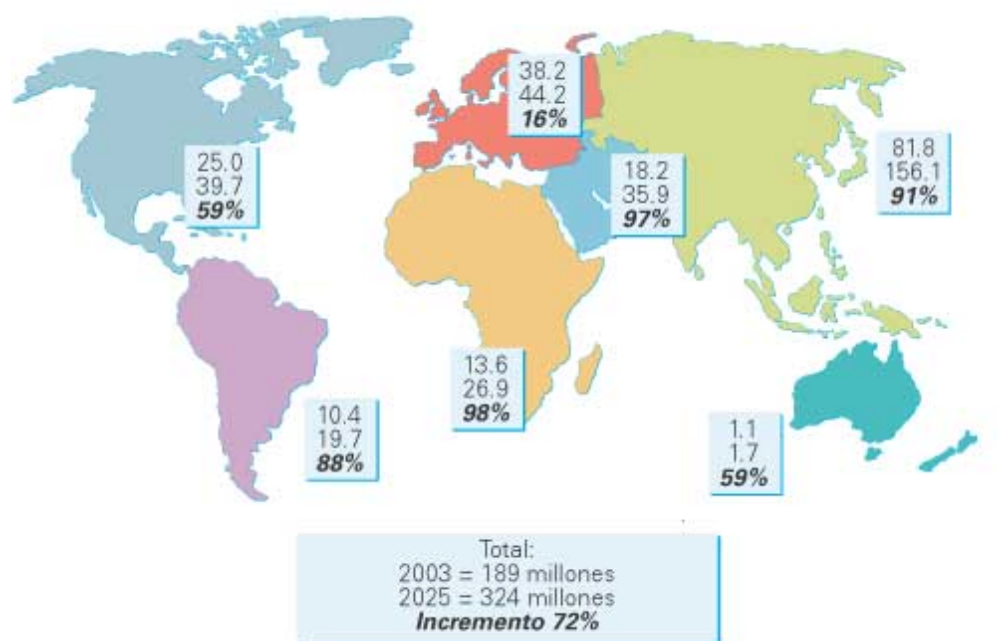
- Fármacos u otras sustancias químicas: unos ejemplos son el raticida vacor y la pentamidina intravenosa que pueden producir diabetes por destrucción permanente de las células  $\beta$  pancreáticas o el ácido nicotínico y los glucocorticoides que pueden afectar a la acción insulínica.
- Infecciones: ciertos virus pueden causar la destrucción de las células beta del páncreas. Entre los virus más relevantes están el causante de la rubeola, el citomegalovirus, el adenovirus y el responsable de la hepatitis C.
- Formas poco comunes de diabetes de naturaleza inmune: por ejemplo existen casos con anticuerpos antirreceptor de insulina, que pueden bloquear la unión al receptor de insulina y producir diabetes.
- Diabetes mellitus gestacional: es cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se descubre durante el embarazo. La prevalencia de DMG oscila entre el 1 y el 14% de los embarazos (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

## **2.4. EPIDEMIOLOGÍA**

La diabetes mellitus es una enfermedad emergente debido al efecto que el progreso ha traído a la sociedad desde el siglo XX; es decir, su prevalencia ha ido en paralelo con el incremento de la obesidad y el sedentarismo (Gadsby, 2002).

La prevalencia mundial de la diabetes mellitus ha aumentado impresionantemente en los últimos 20 años. En 1985 se calculaba que había 30 millones de casos, en tanto que en el año 2000 se calculó que había 177 millones. Con ajuste a las tendencias actuales, para el año 2030 más de 360 millones de personas presentarán

diabetes. La prevalencia de los tipos 1 y 2 de diabetes aumenta a nivel mundial, pero la del tipo 2 lo hace con rapidez mucho mayor, por el incremento en la frecuencia de obesidad y la disminución de los niveles de actividad física conforme se industrializa un número cada vez mayor de países. Las estimaciones a nivel mundial indican que en el año 2030 el número mayor de diabéticos tendrá 45 a 64 años de vida.



**Figura 6.** Mapa sobre la epidemiología de la diabetes mellitus en diferentes zonas del mundo, que muestra el número de millones de personas con diabetes en el año 2003 y el que se estima para el 2025, así como el porcentaje de aumento en la prevalencia de la enfermedad entre ambos años. Fuente: Belen Diego, Rev Esp Econ Salud May-Jun 2003; 2(3).

Existe considerable variabilidad geográfica en la incidencia de diabetes de tipo 1 y tipo 2. Por ejemplo, Escandinavia tiene la tasa máxima del tipo 1 (en Finlandia, la incidencia por año es de 35/100000). La frecuencia de DM de tipo 1 es mucho más baja en la cuenca del Pacífico (en Japón y China, la incidencia anual es de uno a tres por 100000), en Estados Unidos existe una frecuencia intermedia (8 a 17/100000 por año). La prevalencia de DM de tipo 2 es máxima en determinadas islas del Pacífico, intermedia en países como India y Estados Unidos, y relativamente baja en Rusia (Harrison. Principios de medicina interna). Existe una predisposición racial a la DM2 (Lindeman y cols., 1998). Existe también una determinación genética en todos los

grupos raciales (Ramachandran *y cols.*, 1999). En muchas zonas del mundo la DM2 aparece en proporciones epidémicas. Los grupos conocidos con mayor prevalencia son los indios Pima, residentes en una reserva del Estado de Arizona, y la población de Nauru, en Oceanía, donde la enfermedad afecta a más del 20% de sus habitantes (Alberti, 1993). No obstante, otras poblaciones también tienen elevadas tasas de enfermedad. En general, las poblaciones más afectadas son aquellas donde el estilo de vida tradicional ha dejado paso al occidental, o bien se han industrializado rápidamente en un periodo de tiempo relativamente corto (Trevisan *y cols.*, 1998; Zimmet *y cols.*, 1997). Se sabe que la urbanización dobla el riesgo de padecer DM2 en la mayoría de los estudios (Ramachandran *y cols.*, 1999). La incidencia de DM2 alcanza un máximo en los grupos de edad más avanzada. Por ello, en poblaciones con corta esperanza de vida la prevalencia puede parecer falsamente baja. Se considera que la DM2 será una de las epidemias del siglo XXI.

La prevalencia estimada de DM en España se sitúa alrededor del 10% (Goday, 2002). Los últimos estudios poblacionales realizados en España, utilizando el mismo método diagnóstico y aplicando los mismos criterios, ponen de manifiesto diferencias regionales más allá de las diferencias metodológicas: un 11% en Murcia (Valverde *y cols.*, 2006), un 6,4% en Castilla y León (Vega *y cols.*, 2005), un 14,3% en Gerona (Grau *y cols.*, 2007), un 13,3% en Baleares (Rigo *y cols.*, 2005) y un 8,1% en la Comunidad de Madrid (Montalbán *y cols.*, 2010).

Dado que la DM2 es una enfermedad de curso silente, sin un inicio brusco ni una fecha exacta en la que un individuo pasa a padecerla, es difícil plantear estudios de incidencia de la enfermedad. En conjunto, la incidencia anual de DM2 en estudios europeos publicados varía entre 1,2 y 4,1 casos/1000 personas (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### **2.5. COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DM Y SU EPIDEMIOLOGÍA**

Cuando la hiperglucemia es significativa se presenta con la sintomatología clínica de poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso o algunas complicaciones

metabólicas agudas más graves, como pueden ser la cetoacidosis diabética y el síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico.

Las complicaciones crónicas de la DM pueden tener una evolución tórpida, desarrollo lento y presentación clínica poco clara. La retinopatía y nefropatía diabética son las complicaciones microvasculares más frecuentes y la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular y la vasculopatía periférica por enfermedad macrovascular aterosclerótica, además del grupo de complicaciones neurológicas (neuropatía diabética, somática y autonómica), todas ellas relacionadas con la elevada morbimortalidad que presenta la DM (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

La enfermedad cardiovascular (ECV), que incluye cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, constituye la principal causa de mortalidad en individuos con diabetes. Al menos el 5,2% de las muertes por ECV en Estados Unidos es atribuible a la diabetes mellitus.

Se han llevado a cabo múltiples estudios que han puesto de manifiesto un aumento de la incidencia y prevalencia de cardiopatía coronaria en pacientes con diabetes mellitus tanto de tipo 1 como 2. En parte, este hecho está justificado por una mayor carga de factores de riesgo cardiovascular, entre los que se incluyen hipertensión arterial, dislipemia y obesidad. Además, en el paciente diabético se produce un trastorno del sistema de la coagulación con aumento del inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) y del fibrinógeno, alteraciones de la función plaquetaria, disfunción endotelial, inflamación crónica, albuminuria y trastorno de la reactividad vascular mediada por el óxido nítrico. Más allá de estos factores, está el papel de la hiperglucemia por sí misma. En términos globales, estos múltiples factores de riesgo junto con la hiperglucemia implican un aumento de 2-4 veces el riesgo de cardiopatía coronaria y de mortalidad de origen cardiológico en comparación con controles no diabéticos de edad y sexo similares.

El 80% de todas las muertes relacionadas con la diabetes mellitus es atribuible a las manifestaciones macrovasculares de la enfermedad, siendo la enfermedad vascular diabética la responsable del incremento de 2 a 4 veces la incidencia de enfermedad

coronaria isquémica e infarto agudo de miocardio, así como del aumento del riesgo de fallo cardiaco (de 2 a 8 veces) en comparación con pacientes no diabéticos. Además, esta mortalidad es más prematura (Ascaso, 2007).

Así pues, la diabetes mellitus supone un elevado riesgo vascular a largo plazo, que puede materializarse en pequeños y grandes vasos. La afectación de los pequeños vasos de la microcirculación en diversos territorios da lugar a las denominadas “complicaciones microvasculares”, que se consideran específicas de la enfermedad y que incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía diabéticas. Adicionalmente, en los últimos años se ha comprobado una típica microangiopatía diabética de los microvasos miocárdicos, que acaba originando alteraciones de la contractibilidad a expensas de una disfunción ventricular diastólica (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

La nefropatía diabética está presente entre el 3 y el 35% de los pacientes con DM2. El riesgo relativo de padecer insuficiencia renal es 25 veces superior entre los sujetos que padecen DM. Del 30 al 50% de estas personas, con una evolución de la enfermedad de 10 a 20 años, presentan algún grado de afectación renal. Actualmente, la DM supone la primera causa de inclusión en programas de hemodiálisis en España (Amenábar y cols., 2000).

La retinopatía diabética afecta entre el 15 y el 50% de los pacientes con DM2, presentando alrededor del 10% retinopatías proliferativas. El 20-30% de las cegueras registradas son consecuencia de la retinopatía diabética (Fernández Vigo y cols., 1994). Entre los afiliados a la Organización Nacional de Ciegos de España (ONCE), la DM es la tercera patología causante de deficiencia visual. La DM presenta un riesgo relativo de pérdida de visión 20 veces superior al de la población no diabética. Las cataratas son 1,6 veces más frecuentes en la población diabética (Fernández Vigo y cols., 1994). Después de 20 años del diagnóstico de diabetes, prácticamente el 100% de los pacientes con DM1 y el 60% de los pacientes con DM2 presentan retinopatía diabética (Amenábar y cols., 2000).

La neuropatía diabética es la complicación más frecuente de la DM2, estimándose que alrededor del 40% de los diabéticos presentan algún tipo de alteración

neuropática en el momento del diagnóstico. Su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución de la diabetes y con la edad del paciente. El riesgo relativo de neuropatía entre los diabéticos es siete veces superior al de la población general. Así, la polineuropatía diabética afectaría a más del 40% de la población de pacientes con DM con más de 10 años de evolución de su enfermedad (Cerrato, 1998).

Aunque la incidencia de las complicaciones microvasculares se ha reducido en las últimas décadas gracias a la aplicación de tratamientos modernos, la diabetes sigue siendo la causa más frecuente de ceguera e insuficiencia renal terminal en los países occidentales y una causa importante de neuropatía periférica (Rossing, 2005).

La hiperglucemia crónica es el principal determinante del desarrollo y la progresión de la microangiopatía diabética, como han demostrado varios estudios clínicos (The Diabetes control and complications Trial Research Group, 1993; UK Prospective diabetes study Group, 1998).

También existen otras complicaciones crónicas de la DM como son las del tubo digestivo (gastroparesia, diarrea), genitourinarias (uropatías y disfunción sexual), dermatológicas, infecciosas, cataratas, glaucoma y enfermedad periodontal (Harrison. Principios de medicina interna).

## **2.6. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA DIABETES MELLITUS**

El National Diabetes Data Group y la Organización Mundial de la Salud han propuestos criterios diagnósticos para la DM:

- Una glucemia plasmática al azar igual o superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) acompañada de síntomas de diabetes como pueden ser la poliuria, polidipsia o pérdida de peso no explicada. Se define como “al azar” la extracción sin tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la última toma de alimento.

- Una glucemia plasmática en ayunas superior o igual a 126 mg/dL (7,0 mmol/L). Se define como “ayunas” la ausencia de ingestión calórica durante al menos ocho horas.
- Una glucemia plasmática a las 2 horas durante una prueba de tolerancia a la glucosa mayor o igual a 200mg/dL (11,1 mmol/L). Esta prueba debe realizarse con una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

Todos estos criterios diagnósticos en ausencia de hiperglucemia inequívoca y descompensación metabólica aguda, deberán confirmarse mediante repetición de estos estudios en un día distinto.

Los criterios actuales de diagnóstico de la DM resaltan que la glucosa plasmática en ayunas es el método más fiable y cómodo de diagnóstico de DM en sujetos asintomáticos, además le gusta más a los pacientes, es más reproducible, tiene menos coste y es más fácil de realizar que la glucemia 2 horas post-prueba de sobrecarga oral de glucosa. Por todo esto, la prueba de sobrecarga oral de glucosa, aunque sigue siendo un método válido de diagnóstico de DM, no se recomienda como parte de la atención sistemática (Harrison. Principios de medicina interna; Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

En la DM2 un 40% o más de los afectados desconocen su diagnóstico y por lo tanto éste se hace de forma tardía, y esta es la causa del alto porcentaje de casos que presentan complicaciones vasculares en el momento del diagnóstico.

Se ha propuesto que determinados pacientes adultos asintomáticos desde el punto de vista de diabetes que reúnan algunas características deberían ser sometidos a alguna prueba de despistaje de DM. La ADA (American Diabetes Association) ha establecido una serie de criterios para despistaje de diabetes en individuos adultos como son: un cribado para diabetes se debería considerar en todos los individuos de 45 años o más, sobre todo aquellos con IMC=25 (índice de masa corporal) y, si es normal, repetirlo cada 3 años. El cribado debería considerarse a edades más jóvenes o hacerlo de forma más frecuente en aquellas personas con sobrepeso (ICM>25) y que tengan



factores adicionales de riesgo, como son: inactividad física habitual, familiares de primer grado con diabetes, pertenecer a poblaciones de alto riesgo (afroamericanos, latinoamericanos y asiáticos), hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa o glucemia alterada en ayunas, historia de enfermedad vascular, etc.

Existe un aumento muy significativo de la incidencia de la DM2 en niños y adolescentes, por este motivo también la ADA ha hecho unas recomendaciones para el despistaje de posible DM2 en niños. Estos criterios son: sobrepeso, más 2 de los siguientes factores de riesgo:

- Historia familiar de DM2 en familiares de primer o segundo grado.
- Raza o etnia (americanos nativos, afroamericanos, latinos y asiáticos).
- Signos de resistencia a la insulina o condiciones asociadas a esta resistencia (hipertensión arterial, dislipemia, ovario poliquístico, etc).

Este despistaje en niños y adolescentes se recomienda comenzarlo a los 10 años o al inicio de la pubertad (si esta pubertad ocurre en una edad más joven), realizarlo con una frecuencia de 2 años y la prueba preferida es la glucemia plasmática en ayunas (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

Recientemente se ha demostrado la utilidad del análisis de hemoglobina glicosilada (HbA1c), no sólo en el control glucémico del diabético, sino en el diagnóstico mismo de la diabetes mellitus pudiéndose convertir en una nueva herramienta para el diagnóstico de esta enfermedad (Edelman y cols., 2004; Kim y cols., 2008; Dilli y cols., 2008; Yue y cols., 1982 ). Concretamente en 2009 un conjunto de expertos internacionales en diabetes conformado por miembros de la ADA, de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) y de la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD) recomendaron el uso de la HbA1c en tres estudios de poblaciones con diabetes y retinopatía diabética (The International Expert Committee, 2009). Desde entonces otras sociedades de endocrinólogos han apoyado el uso de la HbA1c en el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (The Endocrine Society, 2010;

American Academy of Family Physicians, 2010). La HbA1c es producto de una reacción lenta, no enzimática e irreversible, entre la hemoglobina y la glucosa sanguínea. Esta reacción está directamente relacionada con las concentraciones de glucosa en sangre y la vida media de los eritrocitos (120 días). En condiciones normales, la hemoglobina glicosilada refleja la glucemia media del organismo durante los 2-3 meses anteriores al análisis. Su valor diagnóstico se basa en que la hemoglobina glicosilada ofrece mayor estabilidad pre-analítica y menor variabilidad biológica, que las mediciones puntuales de glucosa en sangre. En este sentido, se estableció como umbral para el diagnóstico de diabetes mellitus el valor de 6,5% de HbA1c, asociado a una sensibilidad de 81.8% y una especificidad de 84.9% (Kim y cols., 2008). Por otra parte, cuatro estudios realizados en no diabéticos para la determinación de la gama de valores normales, arrojaron valores casi idénticos y, en conjunto, estos estudios definieron consistentemente una gama no diabética de 4,0 – 6,0% de HbA1c (Bash y cols., 2008). Los valores  $\geq 6,0\%$  pero  $< 6,5\%$  corresponden a un alto riesgo de progresión a diabetes. El uso de la HbA1c no está recomendado para el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 ya que ésta suele tener una presentación súbita y causa síntomas antes de los 3 meses de evolución, por lo que el valor de la HbA1c subestimaría el valor real de la glucosa (Zamudio Villarreal, 2010). Por otro lado, un estudio reciente indican que la HbA1c no sería una buena herramienta para diagnosticar la DM en niños y adolescentes, y debido a esto los facultativos que están usando este método podrían estarse encontrando con falsos negativos, es decir, podrían estar dejando algunos casos sin diagnosticar, especialmente debido a que los porcentajes estándar que se consideran DM no serían válidos para los jóvenes. Este estudio muestra que los datos recogidos en pruebas a 1.400 individuos se revelaban bastante inestables en el caso de los adolescentes, por lo que sugiere modificar el umbral (el porcentaje) a partir del cual se considera que un adolescente es diabético e invita a hacer un estudio más exhaustivo para comprobar la dudosa eficacia de este sistema en los individuos más jóvenes (Lee y cols., 2011).

Lamentablemente la DM se suele diagnosticar en estadios avanzados y por tanto ya puede estar afectado algún órgano. Así que el principal reto en la actualidad es conseguir realizar un diagnóstico temprano e identificar todos los posibles factores de riesgo que pueden desencadenar dicha enfermedad para poder definir una estrategia preventiva para poder evitar el desarrollo de la DM.

## 2.7. TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS

En la DM tipo 1 el objetivo es diseñar y poner en marcha pautas de insulino terapia que imiten la secreción fisiológica de insulina, además de cambios en los hábitos de vida del paciente, especialmente relacionado con la dieta y el ejercicio. Dado que los diabéticos de tipo 1 carecen de producción endógena de ésta, la administración de insulina basal exógena es esencial para regular la degradación de glucógeno, la gluconeogénesis, la lipólisis y la cetogénesis. De manera similar, el tratamiento sustitutivo con insulina posprandial debe ser adecuado para la ingestión de carbohidratos y promover un empleo y almacenamiento normales de la glucosa.

Una vez instaurados los cambios en el estilo de vida (principalmente terapia nutricional y ejercicio), el objetivo del tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2 será conseguir un control metabólico optimizado con la máxima seguridad posible, debiéndose plantear como objetivo una hemoglobina glicosilada (HbA1c) <6,5% en las primeras fases de la enfermedad y <7,5% en fases más avanzadas o con riesgo de hipoglucemias. La determinación de hemoglobina glicosilada viene siendo empleada desde hace aproximadamente 30 años para el control de salud de los diabéticos (Jeffcoate, 2004; Lind y cols., 2009).

Se recomienda conseguir un control muy estricto en las primeras fases del tratamiento de la diabetes (HbA1c <6,5%), siempre y cuando el paciente no sea mayor de 70 años, presente complicaciones avanzadas micro o macrovasculares en el momento del diagnóstico o padezca alguna patología asociada que haga aconsejable evitar las hipoglucemias. En este caso, se recomendaría un objetivo de control de HbA1c <7,5%, o el mejor posible primando la seguridad del tratamiento, adaptado a la situación del paciente y a la compatibilidad con los fármacos asociados.

En la actualidad disponemos de una serie de fármacos para el tratamiento de la diabetes, como metformina, sulfonilureas, glinidas, tiazolidindionas, inhibidores de las disacaridasas, inhibidores de la dipeptidil- peptidasa 4 (DPP-4) y agonistas del receptor del péptido 1 semejante al glucagón (*glucagon-like peptide-1* [GLP-1]), que junto con la insulina pueden utilizarse en monoterapia o en asociación.

La elección del tratamiento va a depender de la potencia para reducir la HbA1c, del riesgo de inducir hipoglucemias y del grado de control previo, de la influencia en el peso corporal y de la dislipemia, del impacto preferente sobre la glucemia basal o prandial, de las complicaciones o patologías asociadas que presente el paciente, del riesgo de efectos adversos relacionados con el fármaco, de la tolerancia y del coste.

El tratamiento se divide en tres escalones terapéuticos. En el primero, y si la hiperglucemia no es excesiva (HbA1c: 6,5- 8,5%), la metformina es el fármaco de elección. Sólo en casos de intolerancia o contraindicación se usarán otros fármacos alternativos. Si la hiperglucemia es elevada (HbA1c >8,5%), el tratamiento inicial debe realizarse de entrada con varios fármacos orales en combinación o bien iniciar la insulinización. El segundo escalón (pacientes en los que no se han conseguido los objetivos de control o que, tras un periodo de buen control, presentan un deterioro por la evolución de su diabetes) consiste en la adición de un segundo fármaco de acción sinérgica. Para ello se dispone de diversas opciones, que deben individualizarse en función de las características de cada paciente. Finalmente, el tercer escalón (pacientes tratados con dos fármacos, con mal control metabólico) implica la introducción de insulina basal como opción preferente frente a la triple terapia oral, que se reservará sólo para los casos de resistencia a la insulinización (Menéndez Torre y cols., 2010).

La investigación de los nuevos tratamientos para la diabetes no se detiene ya que se impone la necesidad no sólo de la mejoría del control glucémico, con la consecuente reducción de las complicaciones crónicas, sino alcanzar una mejor calidad de vida que lleve a los que padecen DM a esperar al tratamiento definitivo para la curación de la enfermedad de manera esperanzadora. A pesar de los avances terapéuticos en el manejo de la DM en los últimos años, más del 60% de los pacientes no alcanzan valores de HbA1C menores al 7%. En el caso particular de la DM2 el control glucémico declina con el paso del tiempo, reflejando el progresivo deterioro de la función de la célula beta. Debido a esto muchas investigaciones se han focalizado en identificar nuevos mecanismos involucrados en dicho deterioro y nuevos fármacos que puedan mejorar tanto el control glucémico como evitar esta progresión (Leonard y Samuel, 2005; Curtis, 2007). En los últimos años se reconoce un nuevo mecanismo involucrado en la fisiopatología de la DM tipo 2 que es el déficit de producción y/o acción de las incretinas. Las incretinas son enterohormonas que estimulan la secreción de insulina en

respuesta a la ingesta de nutrientes. Glucagon like péptido-1 (GLP1) y polipéptido insulínotropico glucosa dependiente (GIP) son las principales incretinas descubiertas hasta hoy. Ambas presentan también efecto trófico sobre las células beta de los islotes pancreáticos. GLP-1 presenta otras acciones como son la inhibición de la secreción de glucagón, enlentecimiento del vaciamiento gástrico e inhibición del apetito. Ambas incretinas son rápidamente fragmentadas por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4). Nuevas drogas como los incretinomiméticos, análogos y los inhibidores de DPP-4 se presentan como una terapéutica prometedora para los pacientes con diabetes tipo 2 (Claudia Bayón y cols., 2010). En la actualidad se dispone de exenatida, un incretín mimético análogo de la GLP-1, que se administra por vía subcutánea y, de sitagliptina y vildagliptina, inhibidores de la actividad del enzima DPP4, que se administran por vía oral. El efecto hipoglucemiante observado con estos nuevos fármacos sobre la reducción de la HbA1c parece moderado, ofreciendo como ventaja potencial la ausencia de manifestaciones de hipoglucemia asociadas al tratamiento y su efecto neutro o de disminución de peso. Su uso en monoterapia no está autorizado, estando indicadas como tratamiento asociado a metformina, sulfonilurea o glitazonas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en los que no se consiga un adecuado control glucémico (Boletín Terapéutico Andaluz, 2009).

## 3.LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN LA DIABETES MELLITUS

### 3.1. COMORBILIDAD

La comorbilidad es la presencia de dos o más enfermedades, de etiopatogenia y fisiopatología distintas, en un mismo sujeto. La comorbilidad es frecuente y aumenta con la edad (Palomo y cols., 2006). La comorbilidad es habitual en la hipertensión y la DM. Algunos factores de comorbilidad en la DM son la hipertensión arterial, la dislipemia y la obesidad. Todos estos factores de riesgo que son frecuentes en personas con DM justifican, en parte, el aumento de la incidencia y prevalencia de cardiopatía coronaria en pacientes con diabetes mellitus tanto de tipo 1 como 2 (Ascaso, 2007).

Las dislipidemias son otro de los principales factores modificables de riesgo cardiovascular. Distintos estudios han confirmado el papel predictor y la existencia de una relación causal entre hipercolesterolemia y cardiopatía coronaria. Además, la hipercolesterolemia y la hipertensión arterial se encuentran asociadas frecuentemente, y presentan un efecto conjunto sinérgico sobre el riesgo cardiovascular (Watts y cols., 1992; Velázquez y cols., 2000). También hay que tener en cuenta que diversos estudios han establecido que el tabaquismo incrementa la incidencia de infarto del miocardio y la muerte súbita y potencia los efectos de otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión arterial y las dislipidemias. Un consumo elevado de alcohol produce hipertensión y un estado hipercoagulable, induce arritmias cardíacas y reduce el flujo sanguíneo cerebral. Además se ha observado que un índice de masa corporal elevado tiene un marcado efecto sobre la presión arterial. También es sabido que hay vinculación entre la enfermedad coronaria y el estrés, probablemente en su interrelación con los demás factores de riesgo.

También es frecuente la comorbilidad entre la diabetes y los trastornos psiquiátricos ya que parece que la depresión y la ansiedad se observan con más frecuencia entre los individuos con diabetes cuando se los compara con aquellos sin

DM. El incremento en las tasas de depresión tiende a presentarse independientemente del tipo de diabetes, sobre todo cuando las complicaciones clínicas relacionadas con la enfermedad ya están presentes (Anderson y cols., 2001). La prevalencia de ansiedad entre los individuos diabéticos también es elevada. En un estudio reciente se puso de manifiesto una tasa de 14% de trastorno de ansiedad y de 40% de síntomas ansiosos en los pacientes con DM. Los trastornos alimenticios son más frecuentes en las personas con DM2 (Papelbaum, 2008).

Pero sin lugar a dudas, la comorbilidad principal en la DM es la hipertensión arterial. Es muy frecuente la asociación de las dos patologías, de forma que la prevalencia de hipertensión es el doble entre los pacientes con diabetes que en la población general, y además la presencia de hipertensión supone un factor de riesgo añadido al desarrollo de las complicaciones de la diabetes.

### **3.2. PREVALENCIA**

La HTA y la diabetes se asocian muy frecuentemente de forma que, globalmente, la aparición de hipertensión en individuos inicialmente normotensos que presentan intolerancia a la glucosa o diabetes duplica a la de la población con tolerancia hidrocarbonada normal (Salomaa y cols., 1991). Igualmente, la intolerancia a la glucosa y la diabetes aparecen de forma más habitual en sujetos que son hipertensos que en aquellos que son normotensos (Morales y cols., 1993). La prevalencia y cronología de aparición difieren considerablemente según se trate de diabetes tipo 1 o 2. En la DM1 la hipertensión es poco habitual en el momento del diagnóstico y su desarrollo suele ir asociado al de nefropatía diabética, ocurriendo raramente en ausencia de ésta. La HTA afecta al 5% de los pacientes a los 10 años de evolución de la diabetes, aumentando progresivamente hasta llegar al 30-40% (Fuller, 1993). En cambio en la DM2 la HTA está presente ya en el momento del diagnóstico en alrededor del 40-50% de los pacientes (Fuller, 1993). En los pacientes con DM2 la hipertensión se asocia a otras comorbilidades propias de estos pacientes, como la obesidad o la dislipemia (Reaven, 1998), contribuyendo de forma importante al elevado riesgo cardiovascular de estos sujetos. Si además existe nefropatía diabética, la prevalencia de hipertensión en la DM2 alcanza valores superiores al 80% (Pérez Marever y cols., 2004).

### **3.3. CONSECUENCIAS**

La coexistencia de HTA incrementa de forma destacada el desarrollo y la progresión de las complicaciones micro y macroangiopáticas de la diabetes. La hipertensión es un factor clásico de riesgo cardiovascular y en los pacientes con diabetes tiene un efecto sinérgico en el desarrollo de enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular y vasculopatía periférica. Asimismo, la diabetes empeora los efectos de la hipertensión sobre la función ventricular. La morbimortalidad cardiovascular del paciente diabético hipertenso duplica la del paciente con diabetes no hipertenso y cuadruplica la del sujeto no diabético no hipertenso (The Hypertension in Diabetes Study Group, 1993).

Aunque tradicionalmente se ha considerado que el principal factor implicado en el desarrollo de las complicaciones microangiopáticas es el control metabólico, existen evidencias concluyentes acerca del papel que factores de riesgo cardiovascular como la dislipemia, el hábito tabáquico y, en particular, la HTA tienen en el desarrollo de las complicaciones microangiopáticas. Destaca en este aspecto la importancia patogénica de la HTA sobre el inicio y la progresión de la nefropatía diabética, cuyo riesgo aumenta en dos o tres veces. En presencia de nefropatía diabética la prevalencia de hipertensión dobla a la existente en los pacientes con diabetes sin nefropatía, situándose en cifras alrededor del 80%. La hipertensión es también un factor de riesgo para el desarrollo de retinopatía. Por el contrario, la relación entre neuropatía e HTA no se ha establecido aún de forma clara.

El efecto beneficioso del control de la tensión arterial sobre el desarrollo de nefropatía diabética está bien establecido desde hace años (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### **3.4. FISIOPATOLOGÍA**

Salvo la nefropatía diabética, en la cual la HTA es dependiente de volumen, y los pacientes diabéticos con HTA secundaria a enfermedad vasculorrenal o a



enfermedades endocrinas causantes de diabetes e hipertensión, los mecanismos que causan la elevada prevalencia de HTA esencial en los pacientes con diabetes no están totalmente esclarecidos. Probablemente el origen sea multifactorial e influyan de forma aditiva e incluso sinérgica distintos factores (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### a) Factores genéticos:

La HTA esencial en pacientes con diabetes tiene, igual que en pacientes no diabéticos, un importante componente genético, aunque los genes implicados no están bien identificados. Entre los genes que se han asociado al desarrollo de hipertensión en el curso de la DM2 se hallan el gen de la enzima convertidora de la angiotensina (Ha SK y cols., 2000). Otros genes para los que se ha descrito una asociación entre hipertensión y el riesgo de desarrollar diabetes son genes que modulan receptores  $\beta$ -adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Basándose en estos y otros estudios está claro que en los pacientes con diabetes la hipertensión es de origen poligénico y se precisan más estudios para identificar los genes asociados. Asimismo, la interacción de estos genes y los factores ambientales es importante en el desarrollo de hipertensión y de nefropatía (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### b) Hiperinsulinemia:

La resistencia a la insulina se ha asociado a HTA, habiéndose establecido una correlación inversa entre la sensibilidad a la insulina y la presión arterial (Pinkney y cols., 1994). La insulina ejerce una acción vasodilatadora en el endotelio vascular ya que libera óxido nítrico endotelial y da lugar a vasodilatación, por lo que la resistencia a la insulina podría aumentar la resistencia periférica característica de la HTA en la diabetes (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### c) Aumento de la rigidez arterial:

Además de la menor vasodilatación atribuible a la resistencia a la insulina, los pacientes con diabetes tienen disminuida la elasticidad arterial debido a la glicación proteica y a la prematura y extensa aterosclerosis, que dan lugar a una elevación de la

presión arterial fundamentalmente sistólica (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

d) Expansión de volumen:

Además de la retención hidrosalina en el túbulo provocada por la hiperinsulinemia, la propia glucosa interviene también en la expansión de volumen en el paciente con diabetes. En situación de hiperglicemia parte del exceso de glucosa filtrada se reabsorbe en el túbulo renal proximal mediante un sistema de cotransporte con el sodio, por lo que se incrementa la absorción de este último, contribuyendo a la expansión de volumen (Nosadini y cols., 1993).

e) Sistema renina-angiotensina-aldosterona

No parece que este eje hormonal esté directamente implicado en la patogénesis de la hipertensión en la población con diabetes, en la que habitualmente la renina está descendida por debajo del nivel normal debido a la expansión de volumen (Burns, 2000). Sin embargo, hay evidencias suficientes para pensar que el sistema renina-angiotensina-aldosterona sí tiene un papel en el inicio y sobre todo en la progresión de la nefropatía diabética. Los fármacos que actúan bloqueando este eje son los que presentan un mayor efecto antiproteinúrico y renoprotector (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

f) Sistema nervioso simpático:

Los pacientes con diabetes tienen un aumento de la actividad simpática que contribuye al aumento de la reabsorción de sodio por el túbulo proximal y a la expansión de volumen y elevación de la presión arterial. Se ha sugerido que la leptina, elevada en los pacientes con diabetes tipo 2, aumenta el tono simpático y podría ser un factor en la hipertensión de estos pacientes. (Wolf y cols., 2002).

### g) Alteraciones en el transporte iónico transmembrana:

Existe una asociación entre hipertensión y cambios en el pH intracelular y la composición electrolítica celular, en particular aumento del sodio y calcio intracelulares y descenso del magnesio, debidos a alteraciones en la función de algunos de los mecanismos transportadores de iones de membrana (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### h) Disfunción endotelial:

La disfunción endotelial se caracteriza por la alteración en la respuesta vasodilatadora al óxido nítrico producido por las células endoteliales que regula el tono vascular. La disfunción endotelial está presente ya en estadios iniciales de la diabetes. La reducción en la producción de óxido nítrico se asocia al desarrollo de hipertensión. La acción intrarrenal del óxido nítrico, donde ejerce un efecto natriurético, podría contribuir también al desarrollo de hipertensión en la diabetes (Goligorski y cols., 2001).

## **3.5. DIAGNÓSTICO DE LA HIPERTENSIÓN EN LA DIABETES**

La presión arterial debe determinarse en todos los pacientes diabéticos en el momento del diagnóstico o en la primera visita que se les realice. En los pacientes normotensos sin factores de riesgo añadidos la presión arterial debe determinarse como mínimo anualmente y en cada visita en los pacientes hipertensos o con factores de riesgo, como obesidad, microalbuminuria, tabaquismo o dislipemia. Asimismo, dada la asociación entre hipertensión y diabetes, debe descartarse la presencia de diabetes en los pacientes hipertensos y tener presente el impacto de los fármacos hipotensores con efectos diabetogénicos (Tratado SED de diabetes mellitus. Editorial Médica Panamericana. 2007).

### **3.6. TRATAMIENTO PARA PACIENTES HIPERTENSOS Y DIABÉTICOS TIPO 2**

El tratamiento antihipertensivo es uno de los pilares del manejo integral del paciente con diabetes tipo 2 pues confiere una protección orgánica incluso superior a la del control metabólico (Laakso, 1999).

Respecto al tratamiento de elección de la hipertensión arterial (HTA) en los diabéticos, no existen evidencias que apoyen el uso preferente de inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) o de antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II). De hecho sólo la American Diabetes Association entre los principales consensos defiende, de modo indirecto, esta actitud. IECA y ARA II no han demostrado una clara superioridad global en la prevención cardiovascular frente a otros antihipertensivos. Tampoco han demostrado cardioprotección específica. Los efectos antiproteinúricos de estos fármacos no justifican por sí mismos su uso preferencial en diabetes al medirse con un conjunto de variables subrogadas sin clara significación clínica (García y cols., 2007). Así que, las principales clases de fármacos antihipertensivos han demostrado su eficacia en la prevención de la morbimortalidad cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2 (Armario y cols., 2005).

IECA y ARA II sólo han demostrado eficacia en la reducción de complicaciones diabéticas renales duras en pacientes con nefropatía diabética severa (albuminuria superior a 3 g/día) e insuficiencia renal (o muy próximo a ella). El que la asociación tiazida-IECA sea una opción adecuada para muchos de los pacientes hipertensos y diabéticos no implica que todo diabético deba ser tratado con dos o más fármacos ni que sea preferible utilizar un inhibidor del sistema renina-angiotensina. Tiazidas, como admite y aconseja la Organización Mundial de la Salud y el VII informe del Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, pueden utilizarse, igual que en la población general, en monoterapia en el tratamiento inicial de los diabéticos (García y cols., 2007).

# OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es encontrar biomarcadores urinarios que sirvan para el diagnóstico de la hipertensión y su comorbilidad con la diabetes y para monitorizar en el tiempo la evolución de dichas patologías y de los daños asociados a ellas. Para ello planteamos los siguientes objetivos concretos:

**Objetivo 1:** Establecer y elegir distintos modelos animales (en la ratas) de hipertensión, diabetes y mixtos.

**Objetivo 2:** Identificar marcadores urinarios relacionados con la hipertensión y la diabetes.

**Objetivo 3:** Conocer la posible procedencia de los marcadores urinarios descubiertos.

**Objetivo 4:** Validar la utilidad de los marcadores identificados, en cuanto a su capacidad de diagnóstico, pronóstico y determinación de la eficacia terapéutica a lo largo del tiempo en los modelos animales, así como su posible función como marcadores de daño asociado a las enfermedades sometidas a estudio.

RESULTADOS,  
METODOLOGÍA Y  
DISCUSIÓN

# ARTÍCULO I



## **Hyperglycemia and hypertension synergize to cause incipient renal alterations resulting in increased blood-borne NGAL urinary excretion in rats: Potential diagnostic applications**

### **Abstract**

It is estimated that over 10% of the adult population in developed countries have some degree of chronic kidney disease (CKD). CKD is a progressive and irreversible deterioration of the renal excretory function that results in implementation of renal replacement therapy in the form of dialysis or renal transplant, which may also lead to death. CKD poses a growing problem to society as the incidence of the disease increases at an annual rate of 8%, and consumes up to 2% of the global health expenditure. Diabetes and hypertension are the two leading causes of CKD and end stage renal disease, a situation in which renal replacement therapy (renal transplant or dialysis) becomes compulsory. Microalbuminuria is one of the earliest manifestations and indicators of progression to CKD and bad prognosis. However, new early markers of risk are necessary to better anticipate the course of the disease, and to appropriately handle patients in a pre-emptive and personalized manner. In this article, we describe that the combination of hypertension and hyperglycemia (but not each of these factors independently) cause an increased urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), in the absence of signs of renal dysfunction. We also show that albuminuria is not capable of detecting the additive risk posed by the coexistence of these two risk factors. Finally, our results suggest that urinary NGAL might be prospectively used as a marker of the additive risk of CKD posed by the combination of hypertension and diabetes.

**Key words:** chronic kidney disease, hypertension, diabetes, albuminuria, NGAL, risk markers

## Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a mostly progressive and irreversible loss of the kidneys' function taking place during months or years, finally leading to end-stage renal disease (ESRD) (Lopez-Novoa et al., 2010; Lopez-Novoa et al., 2011). ESRD is characterized by renal failure and the absolute need of renal replacement therapy (RRT), in the form of renal transplant or dialysis, to prevent imminent death and to lower CKD-associated mortality (De Zeeuw et al., 2005; Lopez-Novoa et al., 2010). CKD may be caused by a number of conditions, such as diabetes, hypertension, infections, toxins, reduced renal blood flow, genetic determinants, and others. Among them, diabetes and hypertension are the world leading causes of ESRD (Atkins, 2005). Hyperglycemia and hypertension are risk factors for a number of conditions including renal and cardiovascular diseases. In most instances, the presence of an increasing number of comorbid conditions increases in turn the risk of cardiovascular episodes or of inception and progression of chronic diseases. However, the additive effect of comorbidity on the level of risk is hitherto bereft of quantitative markers, which might be useful at stratifying patients pre-emptively according to their individual risk.

Effective treatments are missing for halting CKD progression and reversing the accumulated injury. The most effective drugs available (most prominently inhibitors of the rennin-angiotensin system) are only capable of slowing down renal degeneration rate (Remuzzi et al., 2006; Carrero and Stenvinkel, 2011). Still, they are useful for preventing the need of RRT during the patient's lifetime, in some cases; or for postponing RRT installation and thus reducing the time during which it is applied. This has an enormous health and socioeconomic repercussion, because of the impairment in life quality and the high and disproportionate cost derived from dialysis. It is estimated that, in developed countries, dialysis consumes about 2% of the total health expenditure, whereas it is applied to 0.1% of the population (Xue et al., 2001; Winkelmayr et al., 2002; Szczech & Lazar, 2004; US Renal Data System, 2009). Consequently, a critical aspect of CKD handling, both from the sanitary and the economic points of view, is the effective and early diagnosis. Traditionally, CKD diagnosis has been mostly performed through the detection of signs of renal dysfunction, most prominently of glomerular filtration estimated from the plasma creatinine concentration. However, the equivalent of over 60% of the renal mass is voided by the time renal dysfunction symptoms appear. For this reason, the discovery of earlier markers poses an urgent challenge in order to

enhance therapeutic efficacy. The most developed of these new markers is the urinary excretion of albumin. Over excretion of small amounts of albumin (30-300 mg/day; termed microalbuminuria) is detected early in the course of diabetic and hypertensive nephropathy (Basi et al., 2008) before other markers are evident. Microalbuminuria is the result of subtle alterations in the sieving properties of the glomerular filtration barrier, in tubular reabsorption, or both. Yet, it is not fully understood whether early microalbuminuria is an early pathophysiological event leading to further damage or contributing to progression, or it is only circumstantially associated to the course of disease. Yet, numerous clinical trials have demonstrated that early microalbuminuria is a factor of progression and bad prognosis (Basi et al., 2008).

Another promising marker under development is urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL; also termed lipocalin-2). NGAL is normally found in the blood. However, its serum and urinary levels increase during inflammation, renal and cardiovascular diseases, certain types of cancer and other conditions (Soni et al., 2010). Because of this, this molecule has gained attention in the last decade as a potential biomarker (Vaidya et al., 2008). Indeed, urinary NGAL (uNGAL) has been developed most intensively as an early and sensitive marker of acute kidney injury (Devarajan, 2010). It was first recognized as a marker of ischemic renal injury in animal models and humans. It anticipates the course of disease much earlier than conventional markers, such as serum creatinine, and has an enhanced prognostic value. Urinary NGAL also correlates with the renal damage inflicted by cisplatin (Mishra et al., 2004; Gaspari et al., 2010), cyclosporine (Wasilewska et al., 2010) and with outcome after kidney allograft transplantation (Lebkowska et al., 2009); and it has been suggested as a potential marker of the transition from AKI to chronic kidney disease (CKD; Ko et al., 2010). Moreover, serum and urinary NGAL have been shown to correlate with different chronic renal diseases of glomerular and tubular origin (Malyszko et al., 2008a; Chaudhary et al., 2010; Soni et al., 2010), including diabetic nephropathy in mice (Kuwabara et al., 2009) and humans (Bolignano et al., 2009), and hypertensive nephropathy (Malyszko et al., 2008b).

In this study, we attempted to study the utility of the evolution of uNGAL to detect and monitor potential additive effects of the comorbid factors hypertension and diabetes in the rat. Interestingly, we found that, independently from an established nephropathy, the excretion of NGAL increased in the urine of rats suffering from the

synergistic action of hypertension and hyperglycemia, and not in the urine from those suffering only from hypertension or hyperglycemia. Increased uNGAL excretion appears to be the result of alterations in its tubular handling. Our results suggest that uNGAL might be useful for profiling and monitoring patients with sustained hypertension and diabetes.

## **Materials and methods**

All reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain), except where otherwise indicated.

### **Animals and experimental protocol**

Male Wistar (Animal Experimentation Service of the University of Salamanca, Salamanca, Spain) and SHR rats (Charles River, Barcelona, Spain) weighing 200-250 g were housed under controlled environmental conditions. They were rendered diabetic (or not, as controls) with a single injection of streptozotocin (60 mg/kg body weight), and followed during 8 months. A subset of control and diabetic Wistar rats was treated with L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME; 40 mg/kg/day during 7 weeks), starting one week after streptozotocin injection, as a second model of hypertension (combined or not with diabetes). Blood pressure was monitored in conscious animals by the tail cuff method (Cibertec, Madrid, Spain). For glycemic control, diabetic rats were injected daily with the necessary dose of insulin to keep glycemia at 300-400 mg/dL. Glycemia was measured weekly with commercial reactive strips (Bayer, Leverkusen, Germany) in a drop of blood from the tail. At different time points, rats were allocated in individual metabolic cages for 24-hour urine sample collection. Urine was cleared by centrifugation, and it was stored at -80 °C until use. 3 and 8 months after streptozotocin injection, rats were anesthetized, and kidneys were perfused by the aorta with saline (0.9% NaCl) and immediately dissected. One was frozen in liquid nitrogen and subsequently kept at -80 °C for Western blot studies. The other one was fixed in buffered 3.7% p-formaldehyde for histological studies. Blood samples were also obtained in heparinized capillaries at different time points by a small incision in the tail tip. Blood was centrifuged and serum was kept at -80 °C until use.

**Histological studies**

Paraffin blocks were made and 5- $\mu$ m tissue sections were stained with Masson's trichromic for the evaluation of fibrosis. Photographs were taken under an Olympus BX51 microscope connected to an Olympus DP70 colour, digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

**Biochemical measurements**

Serum and urinary creatinine ( $Cr_s$  and  $Cr_u$  respectively) and blood urea nitrogen (BUN) concentration were measured by means of the automated analyzer Reflotron® (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain; lower detection limit of 0.5 mg/dL). Creatinine clearance ( $Cl_{Cr}$ ) =  $Cr_u \times 24\text{-h urine output} \times Cr_s^{-1}$ . Urine protein concentration was measured by the Bradford method (68). Urine NAG content was determined by a colorimetric method with a commercial kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) based on the conversion of 3-cresolsulfonphthaleinyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide into the purple 3-cresol-cresolsulfonphthaleinyl. Albuminuria was measured with a commercial ELISA following the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA).

**Western blot**

Western blots were run with (i) urine samples (21  $\mu$ l per sample), (ii) tissue extracts (100  $\mu$ g total protein per sample) prepared by homogenizing the kidneys with a tissue mixer (Ultra-Turrax T8, IKA®-Werwe) at 4 °C in homogenization buffer (140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7.5, 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid –EDTA–, 10% glycerol, 1% Igepal CA-630, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin A, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride –PMSF–), or (iii) albumin-free blood serum. Albumin was removed from serum with a column-based, commercial kit based on the immunological retention of rat albumin (Qproteome Murine Albumin Depletion Kit, Quiagen). Samples were separated by electrophoresis in 10-15% acrylamide gels (Mini Protean II system, BioRad, Madrid, Spain). Immediately, proteins were electrically transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore, Madrid, Spain). Membranes were probed with antibodies against NGAL (MBL, Woburn, MA, USA) and albumin (Abcam, Cambridge, UK). An anti-GM2AP polyclonal antibody was produced and used as described (Quiros et al., 2010).

**Gene expression analysis.** RT-PCR-amplification of NGAL and GAPDH was performed on RNAm samples obtained from kidney tissue with the next primers: for rat NGAL, 5'-TCTGGGCCTAAGGATAACAAC-3' and 5'-AGACAGGTGGGACCTGAACCA-3'; for rat GAPDH, 5'-GTGGTCATGAGCCCTTCCA-3' and 5'-AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'. PCR conditions were: 1 x (95 °C x 5 min); 30 x (95 °C x 1 min + T<sub>m</sub> x 1 min + 72 °C x 1 min); 1 x (72 °C x 5 min); where T<sub>m</sub> was 64 °C for GM2AP, and 61 °C for GAPDH.

**Excretion studies with *in situ* perfused kidneys.** At the end of the treatment, rats treated with gentamicin during 6 days were anesthetized and an extracorporeal circuit for kidney perfusion was set up, as described elsewhere (69), with some modifications. Briefly, the renal artery, vein and ureter of the right kidney were ligated. The renal artery and vein of the left kidney and the urinary bladder were cannulated. Oxygenated and warm (37 °C) Krebs-dextran [40 g/L of dextran (molecular weight 64K-76K) in Krebs solution (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.026 mM EDTA, 11.1 glucose, pH=7.4)] was perfused through the renal artery at 3 mL/min, and was discarded through the renal vein. Urine fractions were collected from a catheter placed in the urinary bladder, starting before the perfusion with Krebs (when blood was still passing through the kidney), and during 2 hours after perfusion with Krebs started. All urine samples were kept at -80 °C until assayed by Western blot for the presence of reg IIIb and gelsolin. In a set of experiments, kidney perfusion experiments were carried out before and after a bolus injection of sodium maleate (400 mg/kg) or saline (as control) administered through a catheter placed into the right jugular vein. Sodium maleate is used to block megalin-mediated proximal tubule reabsorption (Bergeron et al., 1996; Nagai et al., 2001).

### Statistical analysis

Data are represented as the mean ± standard error of n experiments performed, as indicated in each case. Statistical comparisons were assessed by the one-way ANOVA analysis followed by the post hoc Scheffe's test. A p ≤ 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### **Evolution of blood pressure, glycemia and renal function in SHR and Wistar, normo and hyperglycemic rats.**

Blood pressure was significantly higher in SHR than in Wistar through the study. However, no differences in BP were seen between normoglycemic and hyperglycemic rats, either from the SHR or the Wistar strain (figure 1). Glycemia was higher in STZ-treated rats than in controls of either strain, and hyperglycemia was very similar in SHR and Wistar rats (figure 1). No renal dysfunction or injury was observed in any of the experimental groups through the study, as evidenced by similar values of plasma creatinine and urea concentration, and proteinuria (table 1), and the histological study of renal tissue sections (figure 2). NAG excretion and microalbuminuria were higher in hyperglycemic SHR and Wistar rats, compared with their corresponding normoglycemic controls (figure 1). Both parameters closely correlated with the profile of urinary output (figure 1), which suggests that increased NAG excretion and microalbuminuria are due to the wash-out effect rather than to renal injury, as described for other proteins (Martínez Seeber et al., 1982).

### **NGAL urinary excretion is increased in spontaneously hypertensive-diabetic rats.**

Urinary NGAL excretion, a marker associated to a number of pathological circumstances including early diabetic nephropathy, was not increased by hypertension or hyperglycemia in our experimental setting. However, it increased significantly in rats suffering concomitantly of hypertension and hyperglycemia (figure 3). It increased from the first month of hyperglycemia in SHR, and stayed high during the rest of the study.

### **NGAL urinary excretion is also increased L-NAME-induced hypertensive-diabetic rats.**

In order to verify that the increased urinary excretion of NGAL was the consequence of the combined effect of hypertension and hyperglycemia, and not of a particular characteristic of the SHR strain when rendered hyperglycaemic, we also studied the effect of hyperglycemia on the excretion of this marker in a model of induced hypertension. For this purpose, we made Wistar rats hypertensive by chronic treatment with the NO synthase inhibitor L-NAME. As shown in figure 4, L-NAME-treated rats became rapidly hypertensive. Hyperglycemia was induced (previously) in a

subset of animals, which was maintained at values of blood glucose concentration similar to those in SHR (figure 4). Renal function was not impaired in L-NAME-hypertensive and L-NAME-hypertensive-hyperglycemic rats, as indicated by the evolution of plasma creatinine concentration and proteinuria (figure 4). In this setting, NGAL was not increased in the urine in the L-NAME-induced hypertension model. However, when L-NAME treated rats were also rendered hyperglycemic, NGAL appeared in the urine after 7 weeks of hypertension (figure 4). This indicates that chronic coexistence of both factors is necessary to induce a synergistic increase in NGAL urinary excretion.

### **Increased urinary NGAL results from altered tubular handling.**

We also aimed at unraveling the origin of the increased urinary NGAL. Figure 5 shows that the renal tissue NGAL level is not increased in NGAL-excreting rats, that is, in hypertensive-hyperglycemic rats. The reactive band appears a little lower than the typical 25 kDa band found in the urine by us and other authors, as shown in the positive control (C+). This could mean that the observed band might not correspond to NGAL. In any case, no increased expression of NGAL in the renal tissue seems to be able to explain the increased urinary excretion. Moreover, gene expression analysis by RT-PCR showed that neither hypertension or diabetes, nor the combination of both modified the expression of NGAL in renal tissue (figure 5). As such, the only other possible source of the urinary NGAL is the blood irrigating the kidneys, which is partially filtered through the glomerular filtration barrier. In fact, when the kidney of a hypertensive-hyperglycemic rat is perfused with Krebs solution (which does not contain proteins, but rather a high molecular weight dextran to compensate for the oncotic pressure of the blood), NGAL is not excreted with urine any more. This supports the idea that the NGAL observed in the urine of these rats comes from the blood and not from the renal tissue (figure 5). A potential cause of increased urinary excretion of NGAL would be its increased concentration in the blood, which we examined by western blot. We found no increment in NGAL plasma concentration that could account for this effect (figure 5). Because low molecular weight proteins (such as NGAL) freely filtrate through the glomerular filtration barrier, the enhanced urinary excretion must be the consequence of altered tubular handling (i.e. reabsorption). In vivo inhibition of proximal tubule, megalin/cubilin-driven endocytosis with maleate produced only a brief and transient



increase in urinary NGAL, while causing a more sustained excretion of albumin and ganglioside M2 (figure 5).

## **Discussion**

Diabetes and hypertension frequently coexist, and their combination provides additive risk of chronic nephropathy, cardiovascular events and death (Mancia, 2005; Grossman and Messerli, 2008; Sahakyan et al., 2010). As an example, diabetes is responsible for 36.8 % of diagnosed cases of chronic kidney disease (CKD) in the USA (US Renal Data System, 2007). It is thought that up to 15-30% of type 1 DM patients and 20-40% of type 2 will develop renal problems in the evolutionary course of diabetes (López-Novoa et al., 2010). Diabetes is the leading cause of ESRD; near 50% of ESRD patients are diabetic. Hypertension is the second leading cause of end-stage renal disease (ESRD). About 51–63% of all patients with CKD are hypertensive. This number grows to 90% in patients over 65 years. In the corresponding general population the incidence of hypertension is 11–13% and 50%, respectively (López-Novoa et al., 2010). In this article, we propose uNGAL as a prospective marker of the additive risk of CKD posed by the combination of hypertension and diabetes.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL; lipocalin 2) is a 25 kDa protein of the lipocalin superfamily. The lipocalin superfamily comprises proteins formed by 8  $\beta$ -strands composing a  $\beta$ -barrel and enclosing a calyx, which binds and transports low-molecular-weight molecules (Flower et al., 2000). It was initially described in neutrophils, although other cells in the uterus, prostate, salivary glands, lung, trachea, stomach, colon, and kidney express NGAL when subject to different stimuli in physiological and pathological circumstances (Cowland and Borregaard, 1997; Soni et al., 2010). By virtue of its capacity to bind endogenous and bacterial siderophores, NGAL participates in iron metabolism, in the innate immune response against iron-dependent microorganisms (by preventing bacteria from retrieving iron from siderophores), and plays a role in kidney development (Soni et al., 2010). NGAL binds and is transported by cell membrane transporters, such as the megalin-cubilin complex and 24p3 receptor (Devireddy et al., 2005).

NGAL has also been shown to act as a growth factor in stimulated and injured epithelia (Soni et al., 2010). In this sense, a relation has been proposed between inflammation and NGAL expression in neutrophils and epithelial cells (Carlson et al.,

2002). In agreement, NGAL has been shown to be involved in the repair of ischemic renal tubular epithelium (Mishra et al., 2003). Indeed, treatment with exogenous NGAL ameliorates the kidney injury caused by ischemia-reperfusion (Mori et al., 2005). This effect is thought to be mediated, at least in part, by favouring epithelial cell dedifferentiation, proliferation and, thus, repair. Strikingly though, NGAL-deficient mice are significantly protected against the chronic renal damage induced by 75% nephrectomy (Viau et al., 2010). Interestingly, NGAL over-expression in these mice was mediated by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). It can be hypothesized that NGAL is expressed as a mediator of an inflammatory response, initially unleashed as a repair response. In such case, NGAL might act as a repair mediator. However, a persistent inflammatory response has been shown to be detrimental for the acute and chronic kidney repair (reviewed in Lopez-Novoa et al., 2010 and 2011). In those circumstances, NGAL might turn prejudicial overall. Moreover, NGAL has been proposed as a real-time indicator of the progression of chronic renal damage. NGAL also plays a role in the pathogenesis and clinical manifestations of atherosclerosis, acute myocardial infarction and heart failure. It has also been proposed as a potential link between the kidney and the cardiovascular system. In fact, cardiac, vascular and serum levels increase in a number of cardiovascular diseases (Bolignano et al., 2010), including those resulting from CKD.

Increasing serum and urinary NGAL correlates with decreasing glomerular filtration and with increasing renal parenchymal degeneration (Mori et al., 2007; Chaudhary et al., 2010). Under these circumstances, the accumulation of NGAL in the blood is related to the reduced filtration; and its increase in the urine is thought to be the consequence of its increased expression by damaged renal compartments, mostly the tubuli. However, the origin of increased uNGAL in our model is not the renal parenchyma, which is not damaged by the time NGAL is detected in the urine, nor increased gene expression or protein levels are detected in renal tissue homogenates from hypertensive and hyperglycaemic animals (figure 5). When the blood is substituted by a protein-free isotonic and solution (Krebs), no NGAL is detected in the urine of these animals. This indicates that uNGAL comes from the blood. Because of its small size, NGAL filters freely through glomerular barrier. Under normal conditions, filtered NGAL is reabsorbed in the tubules with the concourse of the proximal tubule endocytic complex formed by megalin and cubilin (Hvidberg et al., 2005). Our

experiments show that, although the megalin/cubilin complex participates in NGAL reabsorption, there are other redundant mechanisms capable of achieving full NGAL reuptake shortly after megalin/cubilin voidance. As such, the key alterations caused by sustained hypertension and hyperglycemia leading to NGAL urinary over excretion must be looked for in tubular handling systems different from that of megalin/cubilin. This differs from the mechanism of microalbuminuria in early diabetic nephropathy, which is mainly due to reduced reabsorption through the megalin system. Indeed, both reduced megalin expression (Tojo et al., 2001), and disruption of megalin-dependent reuptake (Hryciw et al., 2004) are thought to mediate microalbuminuria, although the precise mechanism is not fully understood. On the contrary, the mechanism underlying hypertensive microalbuminuria is mostly unknown.

Our results point at a potentially new and different utility of NGAL as a diagnostic (or even prognostic) marker in the course of CKD. NGAL appears in the urine upon the chronically synergistic action of hypertension and hyperglycemia, even in the absence of overt nephropathy. In our experimental model, this capability is not achieved by albuminuria, which more closely correlates with hyperglycemia and increased urine output (probably due to a wash-out effect) than with the additive presence of both risk factors (namely hypertension and hyperglycemia). Both NGAL and albumin are increasingly excreted with the urine as a result of incipient and subtle alterations in their renal handling. However, NGAL might incorporate a new capacity to early detect and quantify the increased risk posed by the synergistic action of hypertension and diabetes; and, prospectively, also to monitor the evolution and prognosis of CKD patients.

Clinical studies are necessary to ascertain the capacity of uNGAL to stratify patients according to their prognosis and their individual risk of progression through CKD, in early stages where no other signs different from microalbuminuria are evident. This pre-emptive and personalized stratification would enable us to transform qualitative risk factors (same status for all hypertensive-diabetic patients) into quantitative parameters that score how hypertension and diabetes affect patients in an individual basis with respect to their specific prognosis on CKD progression. The addition of uNGAL to microalbuminuria, and even to other prospective markers, into wider diagnostic panels might enhance in the near future our capacity to better, earlier

and more specifically gain decision making information on how to deal with potential patients of CKD based on the evolution of the influence of their comorbid conditions.

## References

Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2005; 94: S14-8.

Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander? *Diabetes Care.* 2008; 31 Suppl 2: S194-201.

Bergeron, M, Mayers P, and Brown D. Specific effect of maleate on an apical membrane glycoprotein (gp330) in proximal tubule of rat kidneys. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1996; 271: F908-F916.

Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res.* 2009; 32: 91-8.

Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, Buemi M. From kidney to cardiovascular diseases: NGAL as a biomarker beyond the confines of nephrology. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40: 273-6.

Carlson M, Raab Y, Sevéus L, Xu S, Hällgren R, Venge P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. *Gut.* 2002; 50: 501-6.

Carrero JJ, Stenvinkel P. Predialysis chronic kidney disease in 2010: Novel targets for slowing CKD progression. *Nat Rev Nephrol.* 2011; 7: 65-6.

Chaudhary K, Phadke G, Nistala R, Weidmeyer CE, McFarlane SI, Whaley-Connell A. The emerging role of biomarkers in diabetic and hypertensive chronic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 2010; 10: 37-42.

Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997; 45: 17-23.

Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med.* 2010; 4: 265-80.

Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. (2005) A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 123:1293–1305.

Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1482: 9–24.

Gaspari F, Cravedi P, Mandalà M, Perico N, de Leon FR, Stucchi N, Ferrari S, Labianca R, Remuzzi G, Ruggenenti P. Predicting Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Excretion: A Pilot Prospective Case-Control Study. *Nephron Clin Pract.* 2010 Apr 21;115(2):c154-c160.

Grossman E, Messerli FH. Hypertension and diabetes. *Adv Cardiol.* 2008;45:82-106.

Hryciw DH, Lee EM, Pollock CA, Poronnik P. Molecular changes in proximal tubule function in diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31: 372-9.

Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett.* 2005; 579: 773-7.

Ko GJ, Grigoryev DN, Linfert D, Jang HR, Watkins T, Cheadle C, Racusen LC, Rabb H. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI to CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Feb 24. [Epub ahead of print]

Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* 2009; 75: 285-94.

Lebkowska U, Malyszko J, Lebkowska A, Koc-Zorawska E, Lebkowski W, Malyszko JS, Kowalewski R, Gacko M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C

could predict renal outcome in patients undergoing kidney allograft transplantation: a prospective study. *Transplant Proc.* 2009 Jan-Feb;41(1):154-7.

Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Peña AB, Lopez-Hernandez FJ. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther.* 2010; 128: 61-81.

Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Peña AB, Ortiz A, Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: Clinical implications. *J Transl Med.* 2011; 9:13.

Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, Sitniewska E, Malyszko JS, Poniatowski B, Dobrzycki S. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in non-diabetic patients with stage 2-4 chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2008; 30: 625-8. (a).

Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, Malyszko JS, Pawlak K, Dobrzycki S. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in hypertensive and normotensive patients with coronary artery disease. *Nephrology (Carlton).* 2008; 13: 153-6. (b).

Mancia G. The association of hypertension and diabetes: prevalence, cardiovascular risk and protection by blood pressure reduction. *Acta Diabetol.* 2005; 42 Suppl 1:S17-25.

Martínez Seeber A, Vila SB, Catanzaro OL. The mechanism of urinary kallikrein excretion in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1982 Aug;63(2):217-8.

Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 2534-43.

Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 307-15.

Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K,

Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):610-21.

Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int*. 2007; 71: 967–970.

Nagai J, Tanaka H, Nakanishi N, Murakami T, Takano M. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F337-44.

Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martínez SM, González-Buitrago JM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney Int*. 2010; 78: 1006-15.

Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A: Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006, 116: 288-296.

Sahakyan K, Klein BE, Myers CE, Tsai MY, Klein R. Novel risk factors in long-term hypertension incidence in type 1 diabetes mellitus. *Am Heart J*. 2010 Jun;159(6):1074-80.

Szczzech LA, Lazar IL. Projecting the United States ESRD population: Issues regarding treatment of patients with ESRD. *Kidney Int Suppl*. 2004; 90: S3–S7.

Soni SS, Cruz D, Bobek I, Chionh CY, Nalesso F, Lentini P, de Cal M, Corradi V, Virzi G, Ronco C. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol*. 2010; 42: 141-50.

Tojo A, Onozato ML, Ha H, Kurihara H, Sakai T, Goto A, Fujita T, Endou H. Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem Cell Biol*. 2001; 116: 269-76.

U.S. Renal Data System, *USRDS 2007 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. [http://www.usrds.org/adr\\_2007.htm](http://www.usrds.org/adr_2007.htm).

U.S. Renal Data System, USRDS (2009). 2009 annual data report: Atlas of end-stage renal disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases [http://www.usrds.org/2009/slides/indiv/INDEX\\_CKD.HTML](http://www.usrds.org/2009/slides/indiv/INDEX_CKD.HTML).

Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48: 463-93.

Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest.* 2010; 120: 4065-76.

Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K, Michaluk-Skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol.* 2010 May;25(5):889-97.

Winkelmayer, W. C., Weinstein, M. C., Mittleman, M. A., Glynn, R. J., & Pliskin, J. S. Health economic evaluations: The special case of end stage renal disease treatment. *Med Decis Mak.* 2002; 22: 417–430.

Xue, J. L., Ma, J. Z., Louis, T. A., & Collins, A. J. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2753–2758.



**Table 1**

Evolution of plasma creatinine and urea concentration, and proteinuria during 3 months in normogluceic (NG) and hypergluemic (HG) Wistar and SHR rats. Data represent the mean  $\pm$  standard error of n= 6 animals per condition.

Group	Time (months)	Plasma creatinine (mg/dL)	Plasma urea (mg/dL)	Urinary protein excretion (mg/day)
NG Wistar	0	-	-	10.40 $\pm$ 2.93
	1	-	-	12.88 $\pm$ 2.38
	2	-	-	20.10 $\pm$ 1.78
	3	-	-	17.89 $\pm$ 2.83
HG Wistar	0	-	-	9.46 $\pm$ 1.68
	1	-	-	28.21 $\pm$ 3.51
	2	-	-	31.22 $\pm$ 4.00
	3	-	-	26.51 $\pm$ 4.49
NG SHR	0	< 0.5	42.78 $\pm$ 3.99	25.08 $\pm$ 2.14
	1	< 0.5	45.35 $\pm$ 2.52	20.30 $\pm$ 2.55
	2	< 0.5	40.42 $\pm$ 2.04	15.56 $\pm$ 1.89
	3	< 0.5	41.07 $\pm$ 2.20	14.73 $\pm$ 1.45
HG SHR	0	< 0.5	37.40 $\pm$ 3.50	25.02 $\pm$ 1.43
	1	< 0.5	62.83 $\pm$ 5.45	17.86 $\pm$ 4.29
	2	< 0.5	54.90 $\pm$ 7.24	38.69 $\pm$ 3.02
	3	< 0.5	49.90 $\pm$ 3.15	35.85 $\pm$ 4.97

### Figure legends

**Figure 1.** Evolution of systolic blood pressure, glycemia, albuminuria, NAG excretion and urine output during 3 months in normogluceic (NG) and hypergluiceic (HG) Wistar and SHR rats. Data represent the mean  $\pm$  standard error of n= 6 animals per condition.

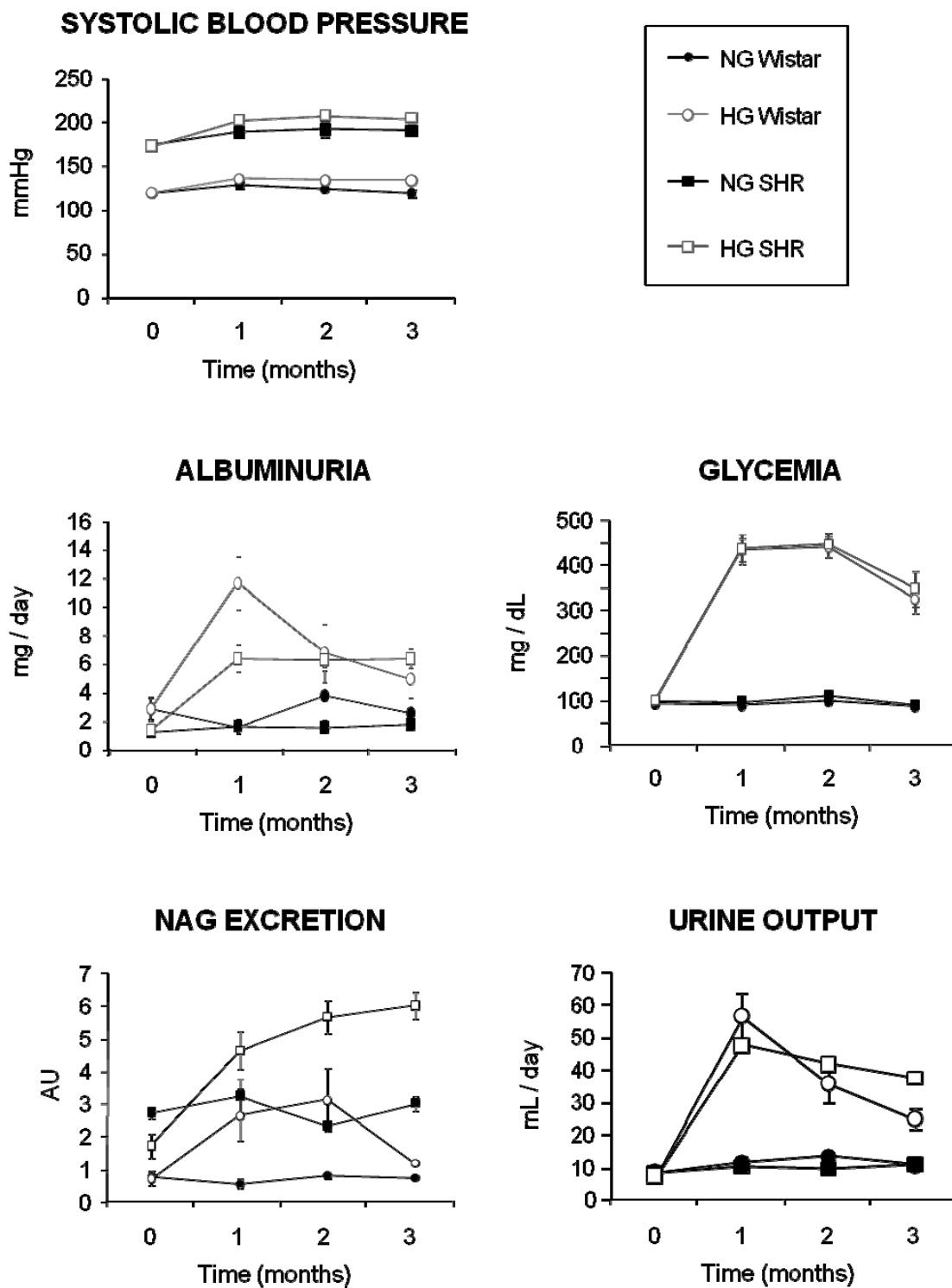
**Figure 2.** Representative images of renal tissue sections stained with Masson's trichromic 3 months after the inception of hyperglycemia (or not, as control) in Wistar and SHR rats. n=4.

**Figure 3.** Evolution of NGAL urinary excretion during 3 months in normogluceic (NG) and hypergluiceic (HG) Wistar and SHR rats. Data represent the mean  $\pm$  standard error of n= 6 animals per condition.

**Figure 4.** Evolution during 7 weeks of NGAL urinary excretion, plasma creatinine concentration, systolic blood pressure, glycemia, urine output and proteinuria in Wistar rats rendered hypertensive with L-NAME, in which hyperglycemia was induced in parallel (or not as control). Data represent the mean  $\pm$  standard error of n= 6 animals per condition.

**Figure 5.** Renal tissue NGAL protein levels, and renal NGAL gene expression analysis (A) and NGAL serum level (B), in normogluceic (NG) and hypergluiceic (HG) Wistar and SHR rats after 3 months of hyperglycemia. C) Effect of in situ perfusion of the renal vasculature with Krebs solution on NGAL urinary excretion in 3-month hyperglycemic SHR rats. B represents a basal urine sample before perfusing Krebs solution, when blood still perfused the kidney. D) Effect of a single i.v. bolus of maleate (or saline as control) in the urinary excretion of NGAL, GM2AP and albumin during the following hour.

Figure 1



**Figure 2**

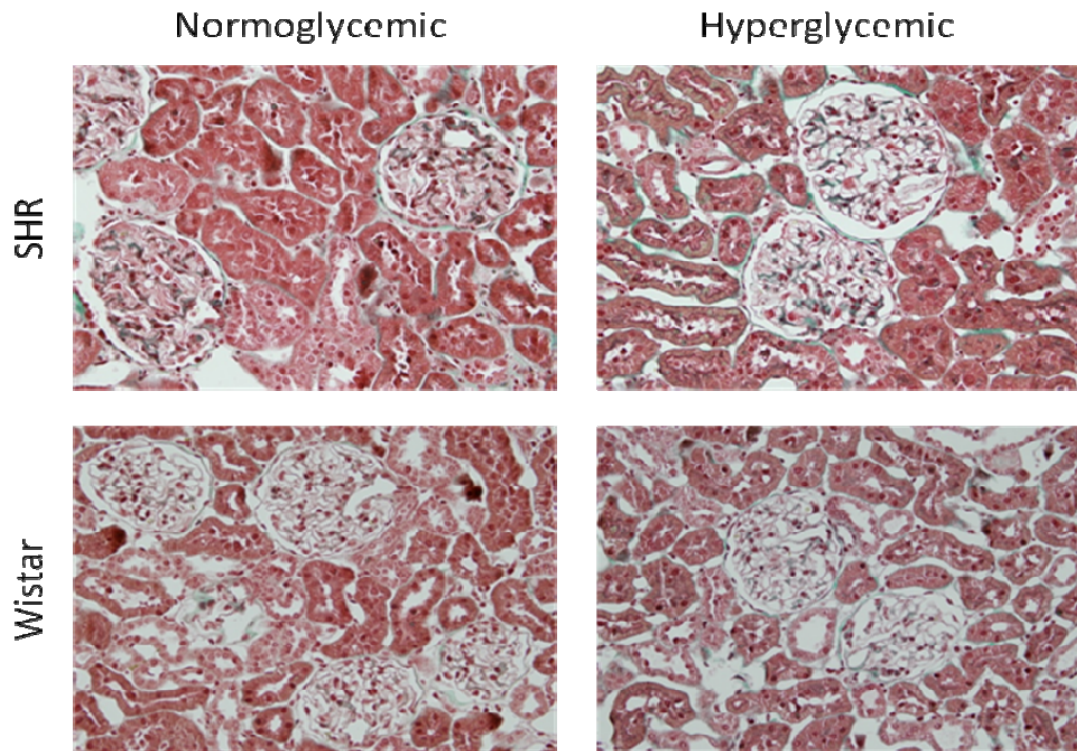


Figure 3

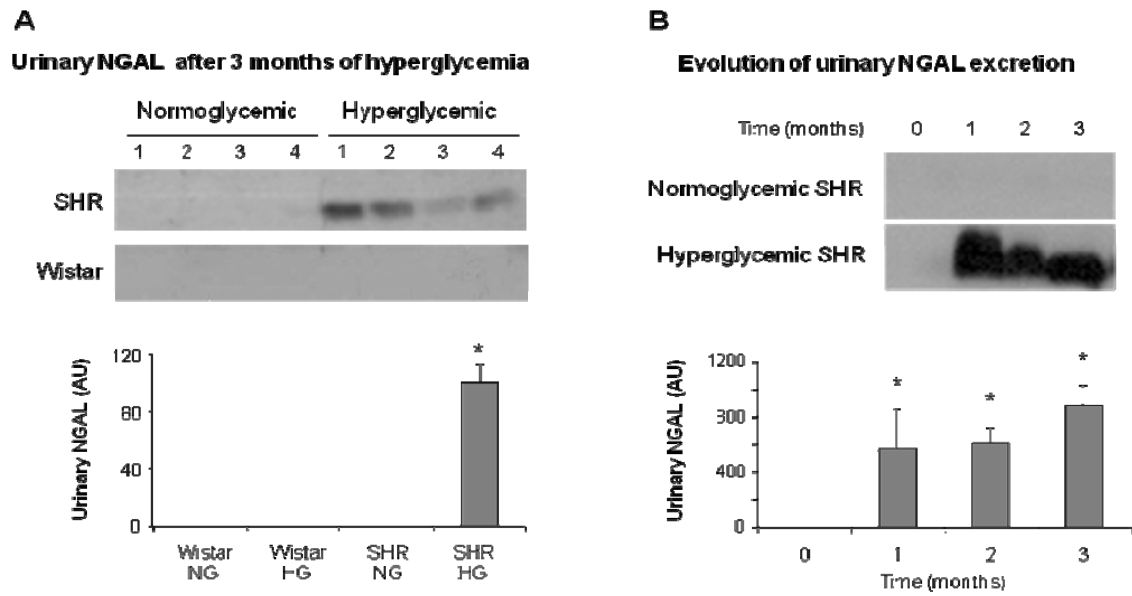


Figure 4

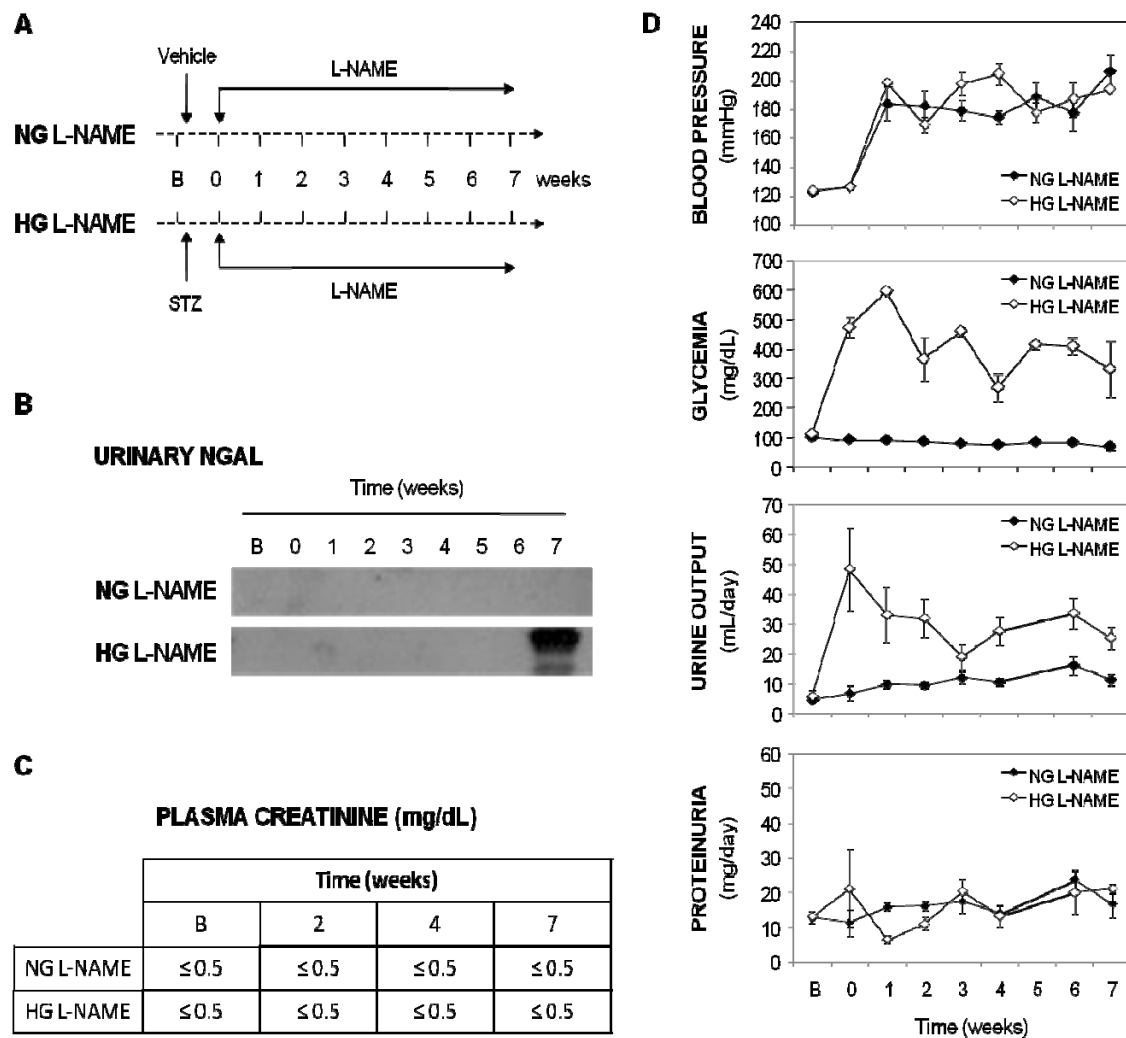
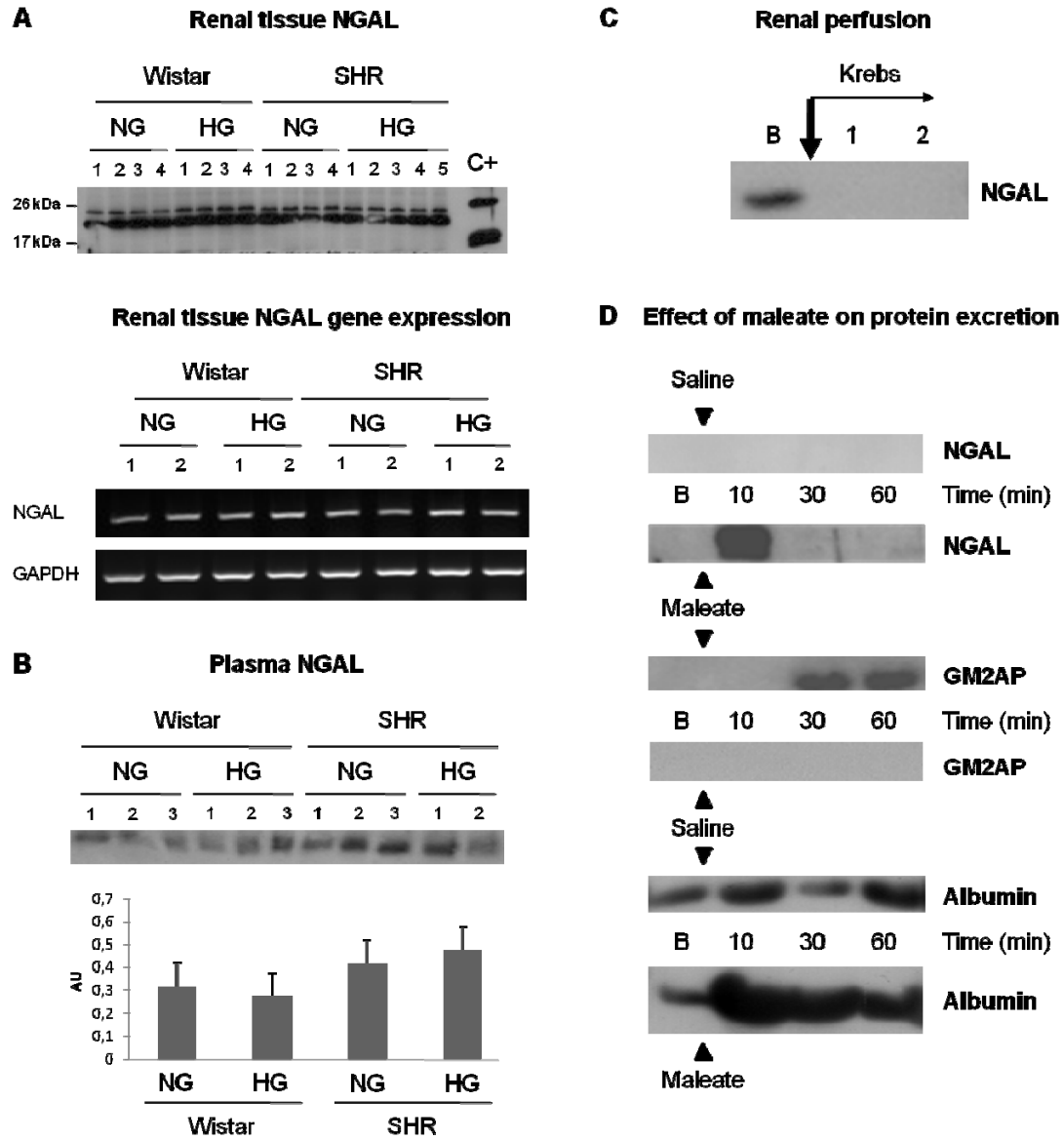


Figure 5



# ARTÍCULO II



## **Sustained hypertension increases KLK9 urinary excretion: Application to the early diagnosis of hypertensive nephropathy and cardiac hypertrophy**

### **Abstract**

Hypertension is the single most important risk factor for cardiovascular disease. Early detection of hypertensive end organ damage and secondary diseases are key determinants of cardiovascular prognosis in patients suffering from arterial hypertension. In the last years, multiple biomarkers have been identified as potential contributors for cardiovascular and renal disease, but there are no identified biomarkers for the detection of the occurrence of vascular and organ (heart, kidney, retina) damage in hypertensive patients. By proteomic and western blot analysis in several experimental models of hypertension in rats (spontaneously hypertensive rats-SHR, renal mass reduction-RMR, L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME)-induced hypertension), we observed that the urinary excretion of the serine protease kallikrein-related peptidase 9 (KLK9) is increased in the presence of hypertension. The ACE inhibitor trandolapril significantly reduced the expression of KLK9 in urine. KLK9 urinary excretion appears before the onset of hypertensive nephropathy. There is no increased expression of KLK9 in kidney, heart, liver, lung or blood serum in the presence of hypertension. KLK9 urinary excretion seems to be correlated to cardiac hypertrophy and the thickening of the aorta wall. In summary, KLK9 appears in the urine in the presence of consolidated hypertension prior to the onset of hypertensive nephropathy, and its appearance seems to be due to renal management changes in the presence of hypertension. KLK9 may be an indicator of the presence of target organ damage (cardiac hypertrophy, arterial wall thickening) associated with hypertension.

**Key words:** KLK9, hypertension, biomarker, renal handling, cardiac hypertrophy, aorta wall thickening

## Introduction

Hypertension is a rather silent condition associated with life-threatening diseases and decreased life expectancy, being the leading risk factor for morbidity and mortality throughout the world (Lopez et al., 2006). Increased blood pressure induces microvascular and macrovascular changes that frequently cause target organ (kidney, heart, vessels, and retina) injury or failure. Because the systems most affected are cardiovascular and renal, hypertension is likely the single most important modifiable risk factor for cardiovascular disease (Koren et al., 2007; Knaapen et al., 2008). The early detection of hypertensive end organ damage and secondary diseases are key determinants of cardiovascular prognosis in patients suffering from arterial hypertension (Mancia et al., 2009), and this early detection can slow or prevent damage, or allow disease regression with adequate therapy, where organ damage is still at a reversible stage.

In the last years, multiple biomarkers have been identified as potential contributors for cardiovascular and renal disease. Promising plasma and urine biomarkers that have become useful for assessment and prognostication of acute or chronic kidney disease, include cystatin C, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1, interleukin-18, asymmetric dimethylarginine, and liver-type fatty acid-binding protein (Nickolas et al., 2008). The analysis of proteins in body fluids (serum, urine) as well as dialysis fluid is possible using proteomics (Weissinger et al., 2004, 2006), which are an emerging technological approach to identify and quantify relevant mediators of vascular disease. Proteomics offer a complementary insight into the full complexity of the disease phenotype, and it is an ideal technology for detecting changes in protein expression or excretion, increasingly used to address questions of transformation and physiology as it allows comparison of two or more samples at a relatively global level, without prior knowledge of the pathways (Blackstock and Weir 1999).

At present there are no identified biomarkers for a quick and inexpensive detection of the occurrence of vascular and organ (heart, kidney, retina) damage in hypertensive patients. These biomarkers should be clinically useful, and thus must be detected in samples easily accessible to the general sampling of the population at risk. It seems logical that the urine can meet these requirements. Therefore, our research group studies and validates preclinical and clinical urinary markers in order to detect early

onset of cardiovascular and renal events associated with hypertension. By proteomic analysis, we have discovered that the urinary excretion of the serine protease kallikrein-related peptidase 9 (KLK9) is increased in the presence of hypertension, as we observed that its urinary excretion is higher in several experimental models of hypertension in rats (spontaneously hypertensive rats-SHR, renal mass reduction-RMR, L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME)-induced hypertension). Therefore, in this study we verified the role of KLK-9 as a urinary biomarker for the presence of hypertension, and we analyzed its origin and possible physiological role as a marker of target organ damage induced by hypertension.

## **Materials and methods**

All reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain), except where indicated otherwise.

### **Animals and experimental protocol**

Animals were kept in an aseptic atmosphere with controlled temperature and light cycles in the facilities of the Animal Experimentation Service of the University of Salamanca, with free access to food and water. Wistar rats were provided by the Animal Experimentation Service of the University of Salamanca (Salamanca, Spain). SHR rats were obtained from Charles River (Barcelona, Spain).

We performed 4 different experimental groups:

1) Both male Wistar and SHR rats, weighting 225-250 g at the beginning of the study, were housed under controlled environmental conditions for three months. Monthly, we monitored their systolic blood pressure in conscious animals by the tail cuff method (Cibertec, Madrid, Spain.) and rats were allocated in individual metabolic cages for 24-hour urine sample collection. Urine was cleared by centrifugation, and it was stored at -80 °C until use.

2) A group of Wistar rats, after anaesthesia with Pentothal (50mg/kg body weight), was subjected to 5/6 nephrectomy (right kidney and the apical pole of the left kidney were removed), also known as 5/6 Renal Mass Reduction (RMR). Sham-

operated rats were used as controls. Monthly, arterial pressure was monitored and urine samples were collected.

3) A subset of Wistar rats was treated with L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME; 40 mg/kg/day for 3, 6 and 9 weeks in drinking water), as a third model of hypertension. Every three weeks, systolic blood pressure was monitored and urine was collected.

4) Another subset of SHR rats was divided into 3 groups: nontreated (control) rats treated with hydralazine (20mg/ kg body weight/day in drinking water) and rats treated with trandolapril (0.7 mg/kg body weight/day in drinking water) (Knoll AG, Ludwigshafen, Germany). Every three weeks, systolic blood pressure was monitored and urine was collected.

At the end of the experimental treatments, rats were anesthetized, and perfused by the aorta with saline solution (0.9% NaCl) with heparin. Immediately, the kidneys, heart, liver and lungs were dissected. Hearts and kidneys were weighted. One half from each organ was frozen in liquid nitrogen and subsequently kept at -80 °C for Western blot studies. The other one was fixed in buffered 3.7% p-formaldehyde for histological studies. Blood samples were also obtained in heparinized capillaries at different time points by a small incision in the tail tip. Blood was centrifuged and serum was kept at -80 °C until use.

These studies were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca, and animals were treated following the Recommendations from the Declaration of Helsinki and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals stated in the international regulations and in the following European and national institutions: Conseil de l'Europe (published in the Official Daily N. L358/1–358/6, 18th December 1986), and Spanish Government (published in Boletín Oficial del Estado N. 67, pp. 8509–8512, 18th March 1988, Royal Decree Law 223/1988, from march 14 and decree from October 13 1989, and Boletín Oficial del Estado N. 256, pp. 31349–31362, 28th October 1990).

### **Characterization of renal function**

Serum and urinary creatinine ( $Cr_s$  and  $Cr_u$  respectively) and blood urea nitrogen (BUN) concentration were measured by means of the automated analyzer Reflotron® (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain; lower detection limit of 0.5 mg/dL). Urine protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford 1976). Urine

NAG content was determined by a colorimetric method with a commercial kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) based on the conversion of 3-cresolsulfonphthaleinyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide into the purple 3-cresol-cresolsulfonphthaleinyl. Albuminuria was measured with a commercial ELISA following the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA).

### **Urinary differential proteomic studies**

24 hour urine samples from Wistar, SHR and RMR rats were used for proteomic studies, basically as described (Quiros et al., 2010), with very few modifications. Briefly, urine was concentrated and desalted through Amicon Ultra 5 K cut-off columns (Millipore, Atlanta, GA, USA). 100  $\mu$ g protein from each sample were precipitated with the Clean-Up kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), rehydrated in 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) Chaps, 0.5% ampholytes (pH 4-7 or 4.5-5.5), 50 mM dithiothreitol (DTT) and bromophenol blue, and separated according to their isoelectric point (500-8,000 V) through immobilized pH gradient (IPG) strips, pH 4-7 (GE Healthcare), using an IPGphor apparatus (GE Healthcare). Then, IPG strips were transferred to acrylamide gels and separated by electrophoresis with a SE 600 Ruby apparatus (GE Healthcare). Gels were fixed overnight in 30% ethanol, 10% acetic acid and silver stained with a commercial kit (GE Healthcare). The spots of interest were cut off the gels, dehydrated in acetonitrile, vacuum-evaporated and resuspended in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Samples were then reduced with 10 mM DTT in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at 56  $^\circ\text{C}$ , and alkylated with iodoacetamide in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Proteins were in-gel digested with porcine trypsin (Promega, San Luis Obispo, CA, USA), and peptides were extracted with 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), vacuum-evaporated and redissolved in 0.1% (v/v) formic acid. Peptide-containing solutions were injected in a MALDI-TOF-TOF. MS/MS spectra were obtained. Protein identification was performed with the MASCOT software ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) against non redundant protein sequence databases (Swiss Prot and NCBI). Mass tolerance was set at 50 ppm, MS/MS tolerance was 0.5 Da, and the taxonomic status was Rattus. Only significant hits, as identified by MASCOT probability analysis, were considered and at least one peptide match with ion score above 20 was set as the threshold of acceptance.

**Excretion studies with *in situ* perfused kidneys and with megalin inhibition**

SHR rats were anesthetized and an extracorporeal circuit for kidney perfusion was set up, as described elsewhere (Quiros et al., 2010), with some modifications. Briefly, the renal artery, vein and urether of the right kidney were ligated. The renal artery and vein of the left kidney and the urinary bladder were cannulated. Oxygenated and warm (37 °C) Krebs-dextran [40 g/L of dextran (molecular weight 64K-76K) in Krebs solution (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.026 mM EDTA, 11.1 glucose, pH=7.4)] was perfused through the renal artery at 3 mL/min, and was discarded through the renal vein. Urine fractions were collected from a catheter placed in the urinary bladder, starting before the perfusion with Krebs (when blood was still passing through the kidney), and during 2 hours after perfusion with Krebs started. All urine samples were kept at -80 °C until assayed by Western blot for the presence of KLK9. In another set of experiments, rats were anesthetized and after a single injection of sodium maleate (400 mg/kg) through the jugular vein, urine fractions were collected from the bladder during the last 15 min of each subsequent hour, for up to 5h (Quiros et al, 2010)

**Western blot analysis**

Proteins were extracted from the organs using a special lysis buffer (25 mmol/l 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 150 mmol/l NaCl, 1% Igepal CA-630, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l EDTA, 2% v/v glycerol, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml aprotinin, 5 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM NaF, 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH=7.5). Protein content of the organ extracts was determined by the Lowry assay (Dc protein assay, BioRad, Hercules CA, USA). Equal amount of proteins were loaded in the Western blot assays. Western blots were run with (i) urine samples (amounts proportional to the daily urine output were loaded in order to determine the total daily excretion), (ii) tissue extracts (100 µg total protein per sample) prepared by homogenizing the kidneys with a tissue mixer (Ultra-Turrax T8, IKA®-Werwe) at 4 °C in homogenization buffer (140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7.5, 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid –EDTA-, 10% glycerol, 1% Igepal CA-630, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin A, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride –PMSF-), or (iii) albumin-free blood serum. Albumin was removed from serum with a column-based, commercial kit based on the immunological retention of rat

albumin (Qproteome Murine Albumin Depletion Kit, Quiagen, Venlo, The Netherlands). Samples were separated by electrophoresis in 10-15% acrylamide gels (Mini Protean II system, BioRad, Berkeley, CA, USA). Western blot assays were performed as previously described (Quiros et al., 2010). Membranes were probed with anti-kallikrein 9 antibody (dilution 1/1000), anti-kallikrein 14 antibody (dilution 1/1000) (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) and anti-kallikrein 3 from (dilution 1/1000) (Millipore, Billerica, MA, USA). Secondary antibodies were donkey anti-goat IgG-horseradish peroxidase conjugated antibody (dilution 1/10000 Santa Cruz Biotechnologies) and goat-anti-rabbit-HRP conjugated from BioRad.

### **Histological studies**

*5- $\mu$ m tissue sections* from buffered formalin fixed, paraffin-embedded tissues were stained with *hematoxilin and eosin*. Masson trichrome staining was applied on 3 mm-thick slices by immersion of sections into Weigert iron hematoxylin followed by Biebrich scarlet–acid fuchsin, phosphomolybdic–phosphotungstic acid and aniline blue. Photographs were taken under an Olympus BX51 microscope connected to an Olympus DP70 colour, digital camera.

### **Immunofluorescence**

Immunohistofluorescence was performed on buffered formalin fixed, paraffin-embedded tissues, which were cut into 5 mm-thick slices. Prior to immunofluorescence staining, samples were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol and distilled water. After these previous steps, samples were permeabilized at 100°C and 1.5 bars for 3'. Blocking (non-fatted milk 2%, Triton X-100 0.1% in PBS) lasted for 1 hour. Samples were incubated with anti-KLK9 antibody (dilution 1/100) for 1 hour and, after a washing step, they were incubated with a secondary antibody Alexa Fluor 488 anti-goat (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (dilution 1/1000). Nuclei were stained with 2mM Hoechst 33258 (Molecular Probes) for 5'. Cover slips were mounted on slides using Prolong gold antifade (Molecular Probes). Confocal images were taken using a Zeiss Axiovert 200M microscope and a Zeiss LSM 510 confocal module (Zeiss, Oberkochen, Germany), with a HeNe laser with 543-excitation for rhodamine and Hg laser with 365-excitation for DAPI. All images were obtained with identical parameters for intensity, pinhole aperture, etc.

### Statistical analysis

Data are represented as the mean  $\pm$  standard error of n experiments performed, as indicated in each case. Except for the study of proteomic results (as indicated above), statistical comparisons were assessed by t-test in two-group comparison and by the one-way ANOVA analysis once the normality of the data was assessed.

## Results

### Urinary proteomics and detection of KLK9

The comparison of urine samples from SHR (obtained 4 months after the onset of hypertension) and Wistar normotensive controls using differential proteomics analysis resulted in the increased urinary excretion of KLK9 in hypertensive animals, as it is shown in figure 1. This increase in urinary excretion of KLK9 was also observed in the 5/6 renal mass reduction-induced hypertension *in vivo* experimental model, with respect to controls (figure 1). Subsequently, the detection of KLK9 was corroborated by Western blot with a specific antibody for this protein, and we observed that KLK9 expression detected by immunoblot was higher in urine from SHR rats than in their normotensive controls, and it was also higher in urine obtained in another model of *in vivo* L-NAME-induced experimental hypertension (figure 1). Moreover, we administered different antihypertensive drugs to SHR, and we observed that the expression of KLK9 in urine was significantly reduced after 6 weeks of treatment with the ACE inhibitor trandolapril, *although the treatment with the vasodilator drug hydralazine did not induce any change in the urinary expression of KLK9* (figure 1). In order to verify the specificity of the antibody used to detect KLK9, we have analyzed the expression of other KLKs in urine by Western blot. Figure 1 shows that the expression of KLK3 and KLK14 follow a different pattern of expression than KLK9, since in both cases their expression is greater in SHR than in Wistar rats. These results suggest that KLK9 is detected only in urine of hypertensive rats, regardless of the experimental model used to induce such hypertension.



**Renal and cardiovascular function evolution in the different experimental hypertension models**

We observed significant increases in systolic blood pressure in every hypertensive experimental model performed, and these increases were reduced in SHR after the administration of antihypertensive drugs, especially after treatment with the ACE inhibitor trandolapril (figure 2). Serum creatinine values remained constant in all experimental groups throughout the study, and we did not detect values higher than 0.5 mg/dl, except in the 5/6 RMR hypertensive model, which had a significant increase in the values of serum creatinine compared to controls (Table 1). Urinary output was not modified in the different experimental models performed, although we observed a significant reduction in the urinary flow in SHR after treatment with the antihypertensive drugs hydralazine and trandolapril (figure 2). NAG urinary excretion is significantly higher in SHR than in their Wistar normotensive controls; however, treatment with L-NAME in Wistar rats during 9 weeks did not induce any significant increase in NAG urinary excretion (figure 2). We have not found any significant change in urinary albumin excretion in SHR compared to their normotensive controls (figure 2), nor have we detected significant changes in proteinuria in SHR, although we observed an increase in urinary protein excretion in the RMR hypertensive model, and also after 9 weeks of L-NAME treatment, with respect to their controls. Treatment with the ACEi trandolapril also reduced urinary protein excretion in SHR rats (figure 2).

**Analysis of KLK9 expression in plasma and *target* organs**

We have analyzed the possible origin of KLK9 studying its expression in several tissues and plasma by Western blot. KLK9 expression is similar in kidney, heart and liver, although its expression does not change in the presence of hypertension. Moreover, its expression is almost absent in lung (figure 3). KLK9 is also detectable in plasma, but there are no differences in its expression either in the presence or absence of hypertension (figure 3). Then we wanted to prove that the blood is the source of KLK9 detected in urine, and then we substituted the renal blood flow for a continuous supply of Krebs buffered solution at 37°C for several hours, collecting urine samples periodically. It can be observed in figure 3 that the urinary excretion of KLK9 is interrupted when the renal blood flow disappears. All these data suggest that KLK9 detected in urine comes exclusively from the plasma, and that the changes observed in urinary excretion of KLK9 in the presence of hypertension seems to be due to different

handling of this substance by the kidney of hypertensive rats, and not due to a different production from heart, kidney, lung or liver. We also wanted to assess whether KLK9 is reabsorbed for any known tubular receptor for macromolecules. Thus, we injected maleate in the jugular vein, which sheds the aminoglycoside receptor megalin from the renal brush-border membrane. After 10 min. in the absence of megalin, KLK9 (as well as KLK3 and KLK14) appears in the urine, but after another 10 min. all these KLKs again disappear from the urine (figure 3). This experiment suggests that these KLKs are reabsorbed in the renal tubule via the megalin receptor, but in the absence of this receptor and after a few minutes, their reabsorption is performed by an alternative receptor.

### **Target organ damage**

Body weight from SHR and RMR rats is reduced with respect to Wistar controls throughout the study. L-NAME-treatment for 9 weeks did not affect the weight of the animals or the size of kidneys and heart (figure 4). After four months of hypertension, cardiac hypertrophy was observed in SHR compared to normotensive controls. Cardiac hypertrophy in SHR rats is reversed after three weeks of treatment with the ACE inhibitor trandolapril. We also observed an enlarged right kidney in SHR compared to Wistar rats (figure 4). The L-NAME experimental model of hypertension induces a thickening of the aorta wall, which is already detectable at 3 weeks, and most notably at 6 weeks. Treatment with the vasodilator hydralazine, and especially with the ACE inhibitor trandolapril, significantly reduces the thickening of the aorta wall observed in SHR rats (figure 5)

### **Discussion**

KLK9 is an enzyme that belongs to the kallikrein subgroup of serine proteases, which have diverse physiologic functions in many tissues (Lundwall et al., 2006; Diamandis et al., 2006). KLK9 is primarily expressed in thymus, testis, spinal cord, cerebellum, trachea, mammary gland, prostate, brain, salivary gland, ovary, and skin (Yousef and Diamandis, 2000). Human KLK9 mRNA is differentially expressed in ovarian and breast cancer, having a prognostic value (Yousef et al., 2003). However, there are no studies linking KLK9 with hypertension. Our results show that the urinary

excretion of KLK9 is increased in three different experimental models of hypertension: spontaneously hypertensive rats (SHR), hypertensive rats after treatment with L-NAME and hypertensive rats after 5/6 renal mass reduction. In addition, urinary KLK9 excretion is markedly reduced in SHR after treatment with antihypertensive drugs, mainly with trandolapril. Surprisingly, treatment with the vasodilator drug hydralazine does not induce significant changes in urinary excretion of KLK9, although this could be due to the fact that the reduction in blood pressure levels induced by this drug was smaller than the reduction induced by the ACE inhibitor trandolapril. All these data suggest that the urinary excretion of KLK9 is indicative of the presence of hypertension.

This is the first study which links increases in urinary excretion of KLK9 with the presence of hypertension. Our results suggest that the elimination of KLK9 in urine occurs in the presence of hypertension, but this urinary excretion is not due to a simple increase in blood pressure, as it is shown by our experiments in the hypertensive model of L-NAME treatment, where blood pressure rises significantly in the first week of treatment, but KLK9 appears in urine after 4 weeks of treatment. It therefore seems necessary that the hypertensive status should be consolidated for KLK9 to appear in urine.

Our study shows no differences in the expression of KLK9 in kidney, liver, heart or lung, regardless of whether rats are hypertensive or normotensive. Furthermore, there are no differences in KLK9 plasma levels either in the presence or absence of hypertension. This suggests that the increase in urine KLK9 detected in the presence of hypertension appears to be due to renal handling of the substance, whose reabsorption seems to be lower in the presence of hypertension. In a similar context, other authors have described that hypertension alters the renal handling of different substances: Jung et al. (2009) showed that salt-sensitive hypertension induced by uninephrectomy modified the regulation of sodium transporters, and this alteration was involved in the pathogenesis of hypertension in this rat experimental model. Other authors indicated that a genetically-determined defect in urinary kallikrein excretion is associated with greater blood pressure sensitivity to salt, possibly due to altered renal sodium handling (Madeddu et al., 1996). Renal calcium transport in the renal tubule is also modified in the presence of hypertension (Petrazzuolo et al., 2010). Folate handling is also modified in hypertensive patients with nephroangiosclerotic damage (Pizzolo et al., 2007).

We have observed that KLK9 is reabsorbed by megalin, a multiligand binding receptor found in the plasma membrane of many absorptive epithelial cells (Christensen and Birn, 2002), because when we infused maleate - which sheds megalin from the renal brush-border membrane - to normotensive rats, KLK9 appears in the urine. After 10 min., KLK-9 disappears from the urine of normotensive rats, suggesting that this substance is using an alternative recapture system in the tubule. Therefore, megalin does not appear to be essential for KLK9 reabsorption in the kidney.

KLK9 is indicating the presence of hypertension, and it appears in urine in stages prior to the appearance of renal function deterioration (serum creatinine remains constant, except in the RMR group). The fact that KLK9 is detected in the presence of hypertension before the onset of detectable renal damage may indicate that this KLK9 may be used as a marker for early diagnosis of hypertensive nephropathy.

The fact that we detected cardiac hypertrophy and an increase in the thickness of the aorta wall in SHR rats (which excreted KLK9 in urine), and that these effects are reverted with trandolapril (whose treatment also reduces the expression of KLK9 in urine) may indicate a possible role of this molecule as an indicator of the presence of cardiac hypertrophy and arterial thickening.

In summary, our study shows that KLK9 is a molecule that appears in the urine in the presence of consolidated hypertension in stages prior to the onset of hypertensive nephropathy, and its appearance is due to renal management changes in the presence of hypertension. The increase in urinary excretion of KLK9 seems to be an indicator of the presence of target organ damage (cardiac hypertrophy, arterial wall thickening) associated with hypertension. Further experiments will be needed to elucidate the mechanisms that modify the renal handling of this substance in the presence of these pathologies.

## **References**

Blackstock, W. P., Weir, M. P., Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 1999, 17, 121–127

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-549

Christensen EI, Birn H. "Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors.". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (4): 256–66, 2002

Diamandis, Eleftherios P.; Deperthes, David; Lundwall, Åke. Proceedings of the 1st International Symposium on Kallikreins, Lausanne, Switzerland, September 1-3, 2005. *Biol. Chem.* 387 (6): 635–824, 2006

Jung JY, Lee JW, Kim S, Jung ES, Jang HR, Han JS, Joo KW. Altered regulation of renal sodium transporters in salt-sensitive hypertensive rats induced by uninephrectomy. *Electrolyte Blood Press.* 2009 Dec;7(2):58-66. Epub 2009 Dec 31.

Knaapen P, Germans T, Camici PG, et al. Determinants of coronary microvascular dysfunction in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H986–93.

Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med.* 1991;114:345–52. Tune JD. Control of coronary blood flow during hypoxemia. *Adv Exp Med Biol.* 2007;618:25–39

Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367: 1747–57

Lundwall A, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ, Olsson AY, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stenman UH, Stephan C, Talieri M, Yousef GM. A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol. Chem.* 387 (6): 637–41, 2006.

Madeddu P, Varoni MV, Demontis MP, Pinna-Parpaglia P, Glorioso N, Anania V. Blood pressure sensitivity to salt in rats with low urinary kallikrein excretion. *Immunopharmacology.* 1996 Jun;33(1-3):301-4

Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, et al.: Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *J Hypertens* 2009; 27: 2121–58

Nickolas TL, Barasch J, Devarajan P. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 127 – 132

Petrazzuolo O, Trepiccione F, Zacchia M, Capasso G. Hypertension and renal calcium transport. *J Nephrol*. 2010 Nov-Dec;23 Suppl 16:S112-7

Pizzolo F, Girelli D, Friso S, Pavan C, Martinelli N, Guarini P, Faccini G, Corrocher R, Olivieri O. Altered renal folate handling in hypertensive patients with nephroangiosclerotic damage. *J Hum Hypertens*. 2007 Apr;21(4):327-9

Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martínez SM, González-Buitrago JM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney Int*. 2010 Nov;78(10):1006-15.)

Weissinger EM, Kaiser T, Meert N, De Smet R, Walden M, Mischak H, Vanholder RC: Proteomics: A novel tool to unravel the pathophysiology of uraemia. *Nephrol Dial Transpl* 19: 3068–3077, 2004.

Weissinger EM, Nguyen-Khoa T, Fumeron C, Saltiel C, Walden M, Kaiser T, Mischak H, Drueke TB, Lacour B, Massy ZA: Effects of oral vitamin C supplementation in hemodialysis patients: A proteomic assessment. *Proteomics* 6: 993–1000, 2006

Yousef GM, Diamandis EP. The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member, KLK-L3 (KLK9). *Genomics* 65 (2): 184–94, 2000

Yousef GM, Scorilas A, Nakamura T, Ellatif MA, Ponzzone R, Biglia N, Maggiorotto F, Roagna R, Sismondi P, Diamandis EP. The prognostic value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 Mar;78(2):149-58

**Table 1**

Serum creatinine (mg/dl)

Time (months)	Wistar rats	SHR	RMR rats
0	<0.5	<0.5	<0.5
1	<0.5	<0.5	1.173
2	<0.5	<0.5	0.865
3	<0.5	<0.5	0.935
4	<0.5	<0.5	0.910

## Figure legends

**Figure 1.** KLK9 expression detected in 2D gels by differential proteomics and by Western blot in urine from SHR, 5/6 RMR-hypertensive rats and L-NAME-induced hypertensive rats, KLK3 and KLK14 expression in urine from SHR rats and effect of hydralazine and trandolapril treatment on KLK9 urinary excretion. Pictures show representative blots (see Methods for details).

**Figure 2.** Renal and cardiovascular function evolution. Systolic blood pressure, urine output, NAG urinary excretion, albuminuria and proteinuria. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3.** Western blot evaluation of KLK9 expression in kidney, heart, liver and lung, plasma, and KLK9 expression in urine from *in situ* perfused kidneys and after megalin inhibition. Pictures show representative blots (see Methods for details)

**Figure 4.** Evolution of body weight and changes in heart and kidney weight in the different experimental groups and after antihypertensive treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5.** Effect of L-NAME treatment and hydralazine and trandolapril treatment on the thickening of the aorta wall. Representative microphotographs of hematoxylin-eosin staining and Masson trichrome.



**Figure 1**

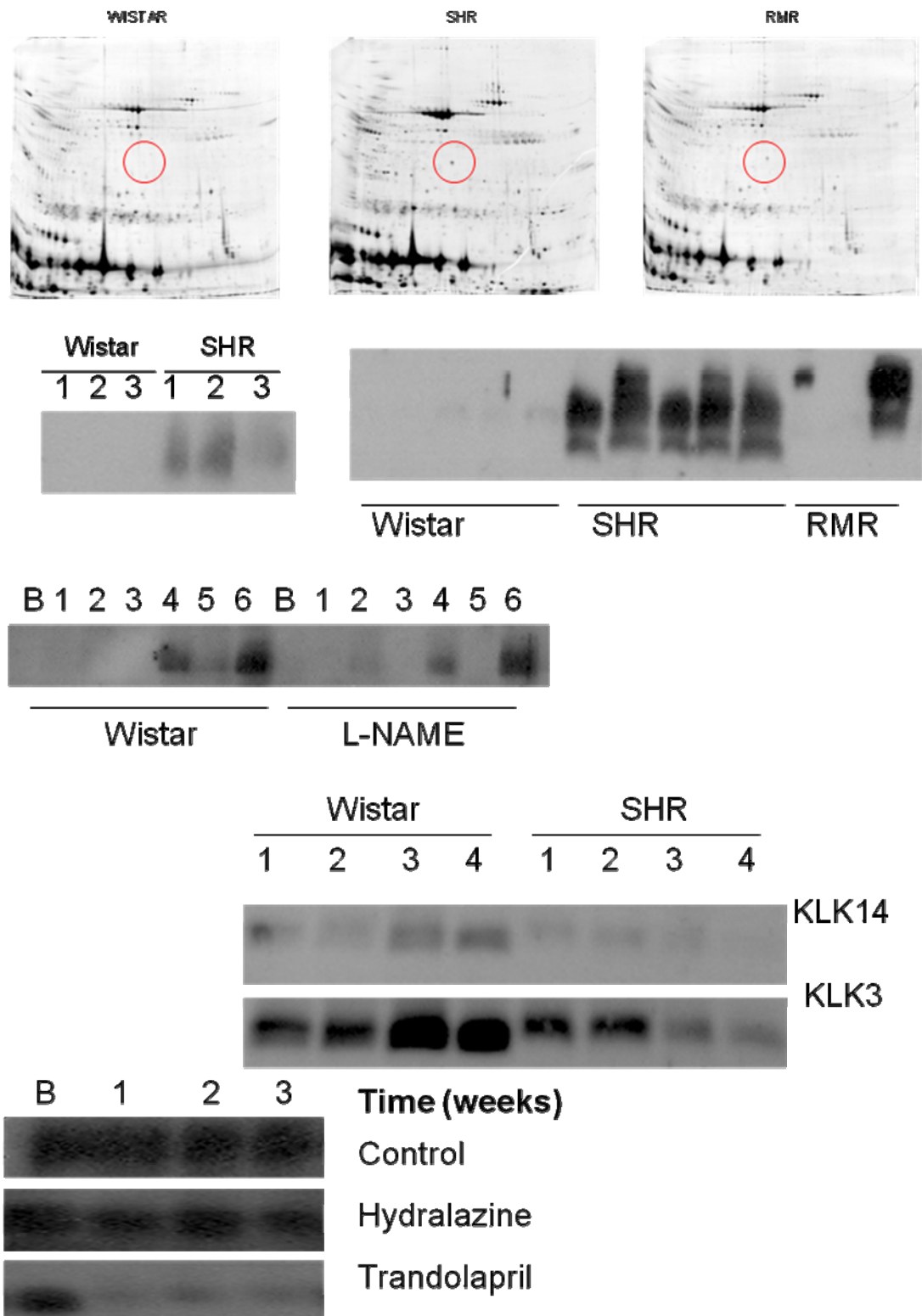
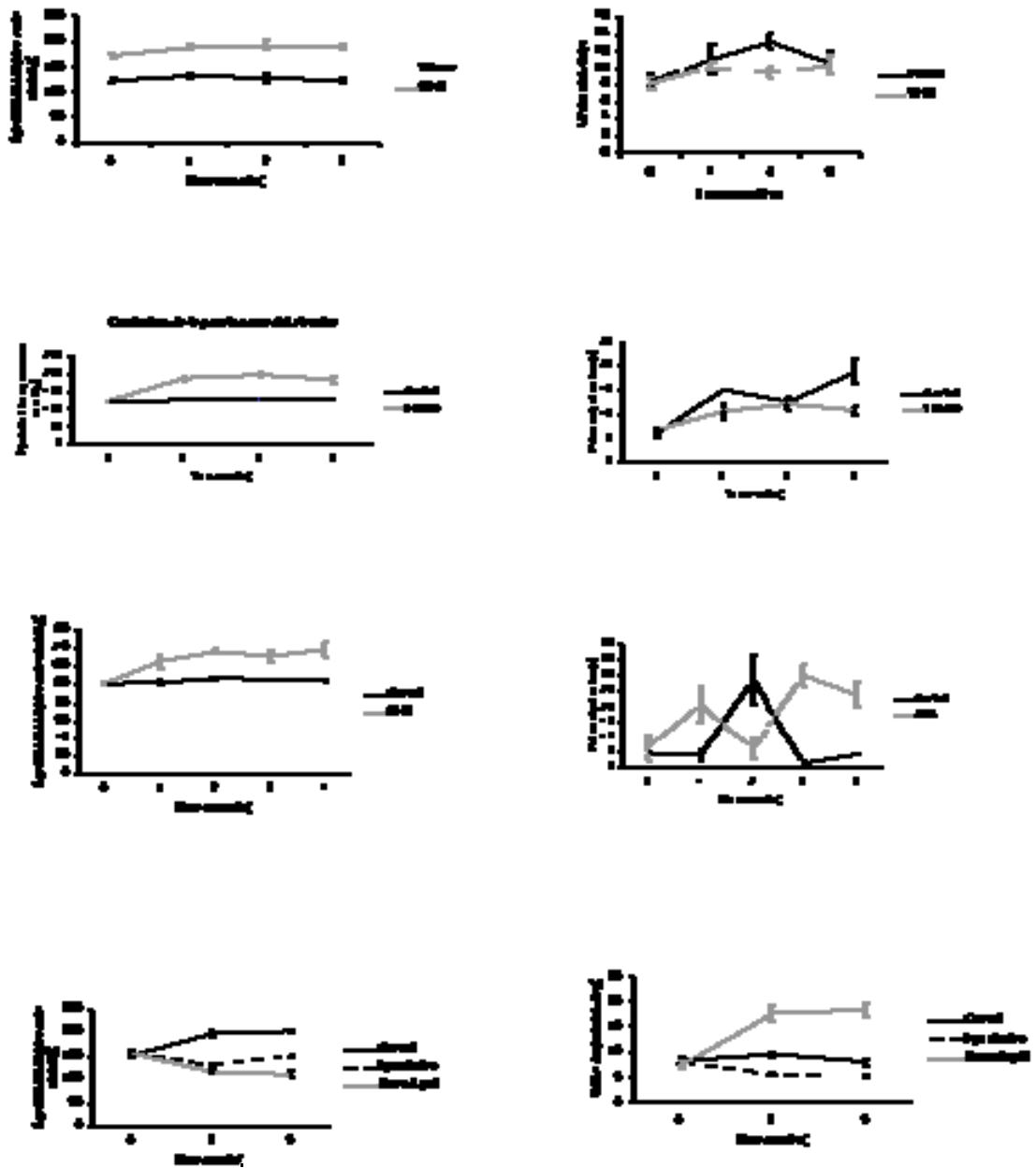
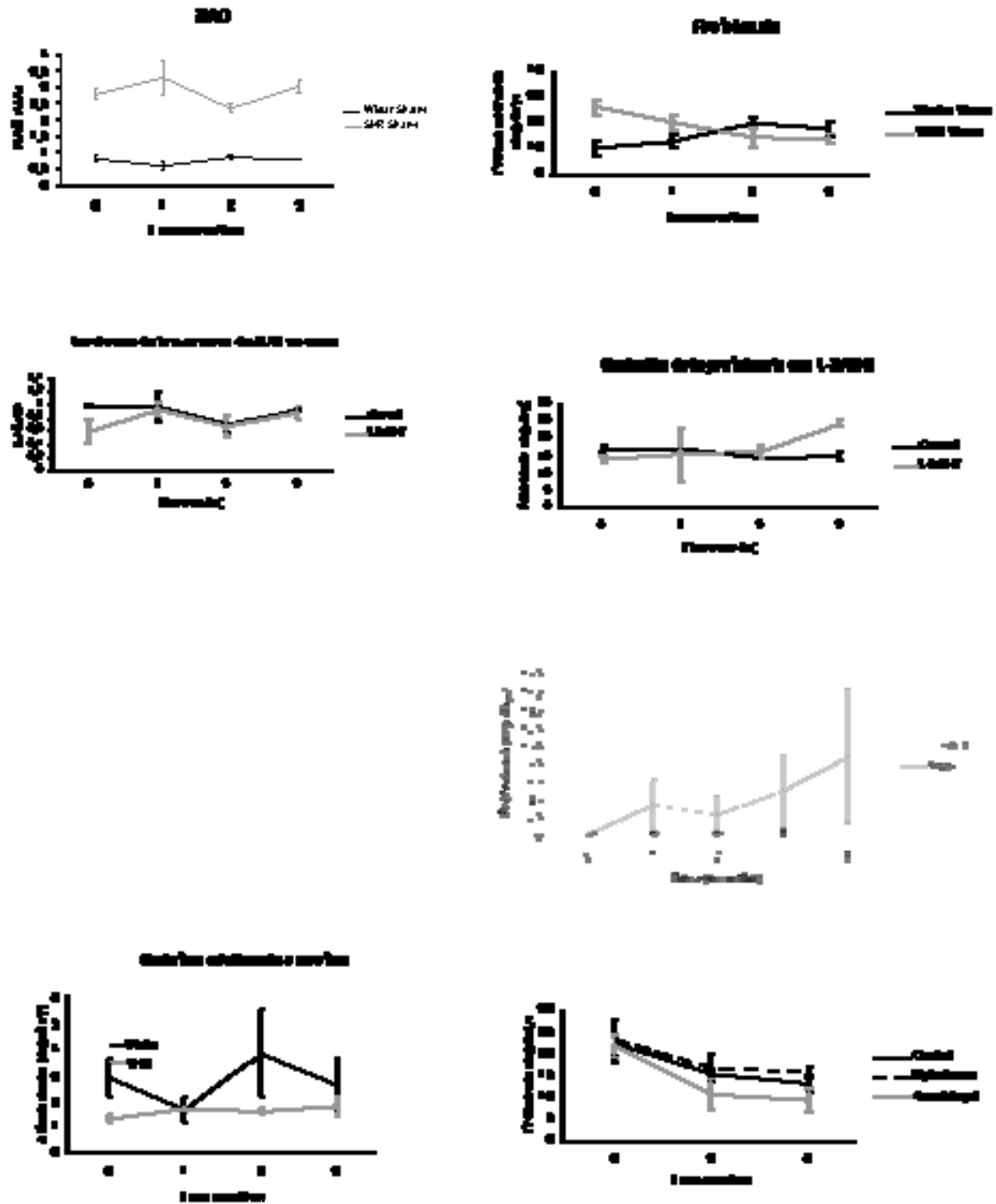


Figure 2





**Figure 3**

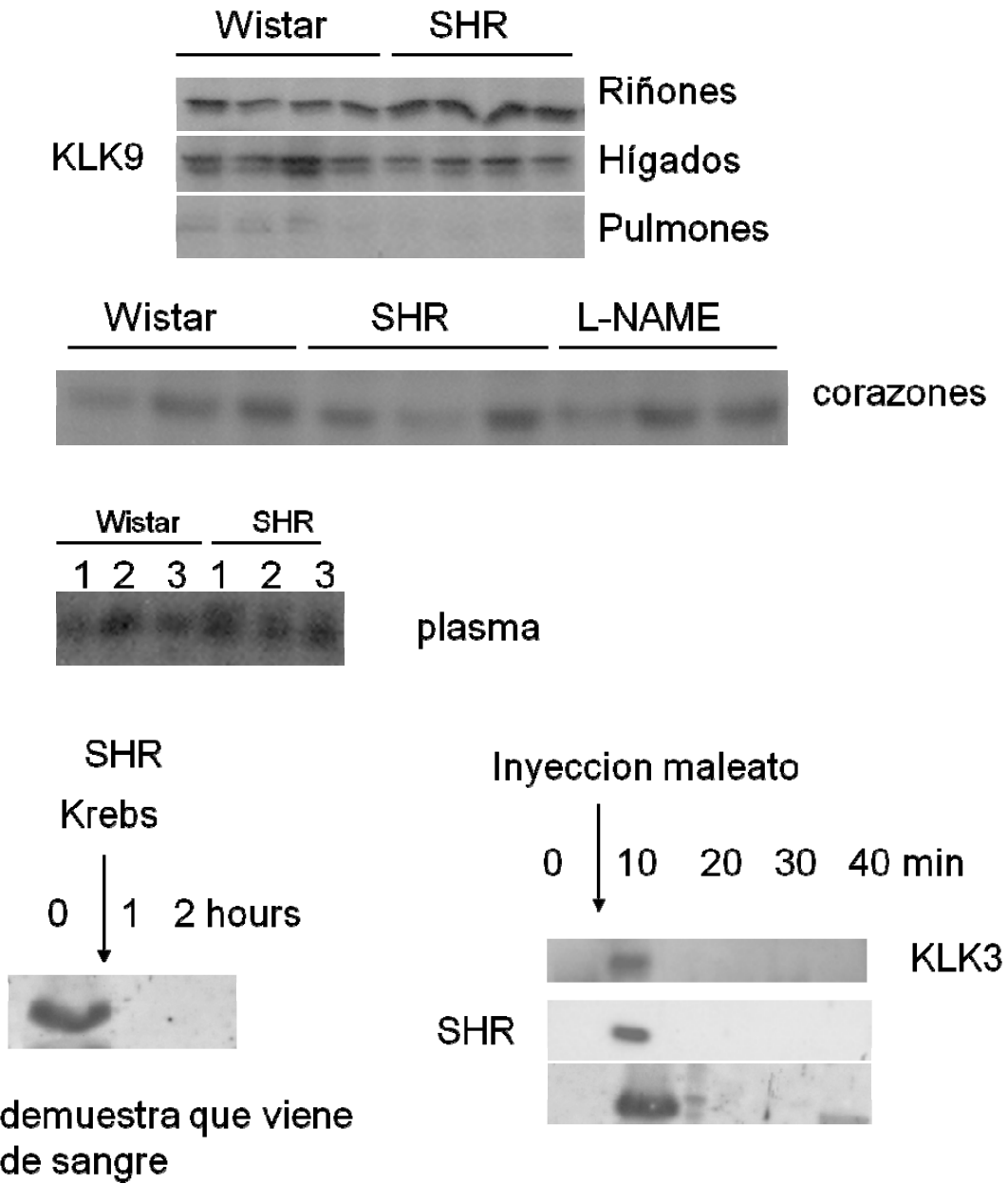


Figure 4

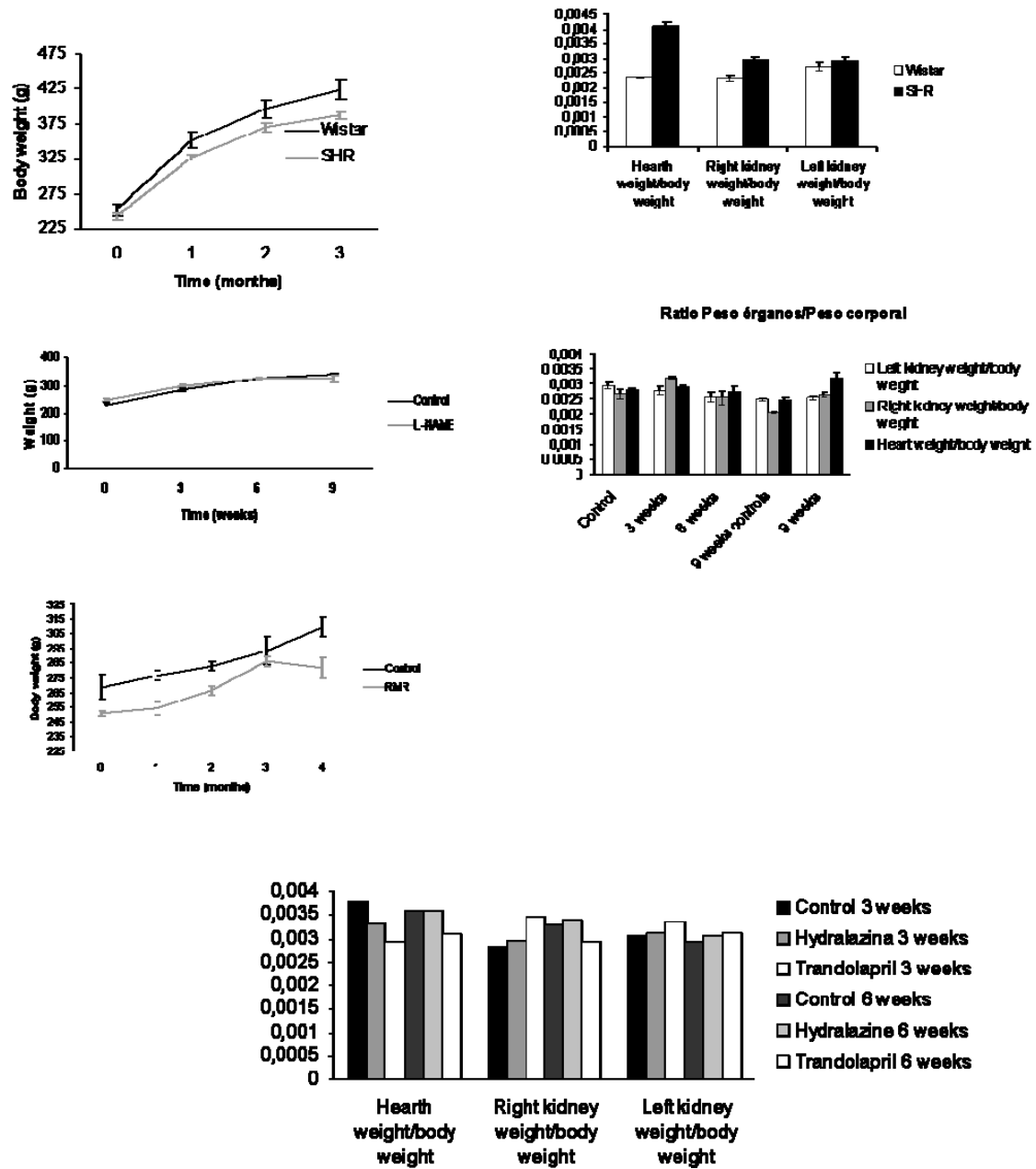
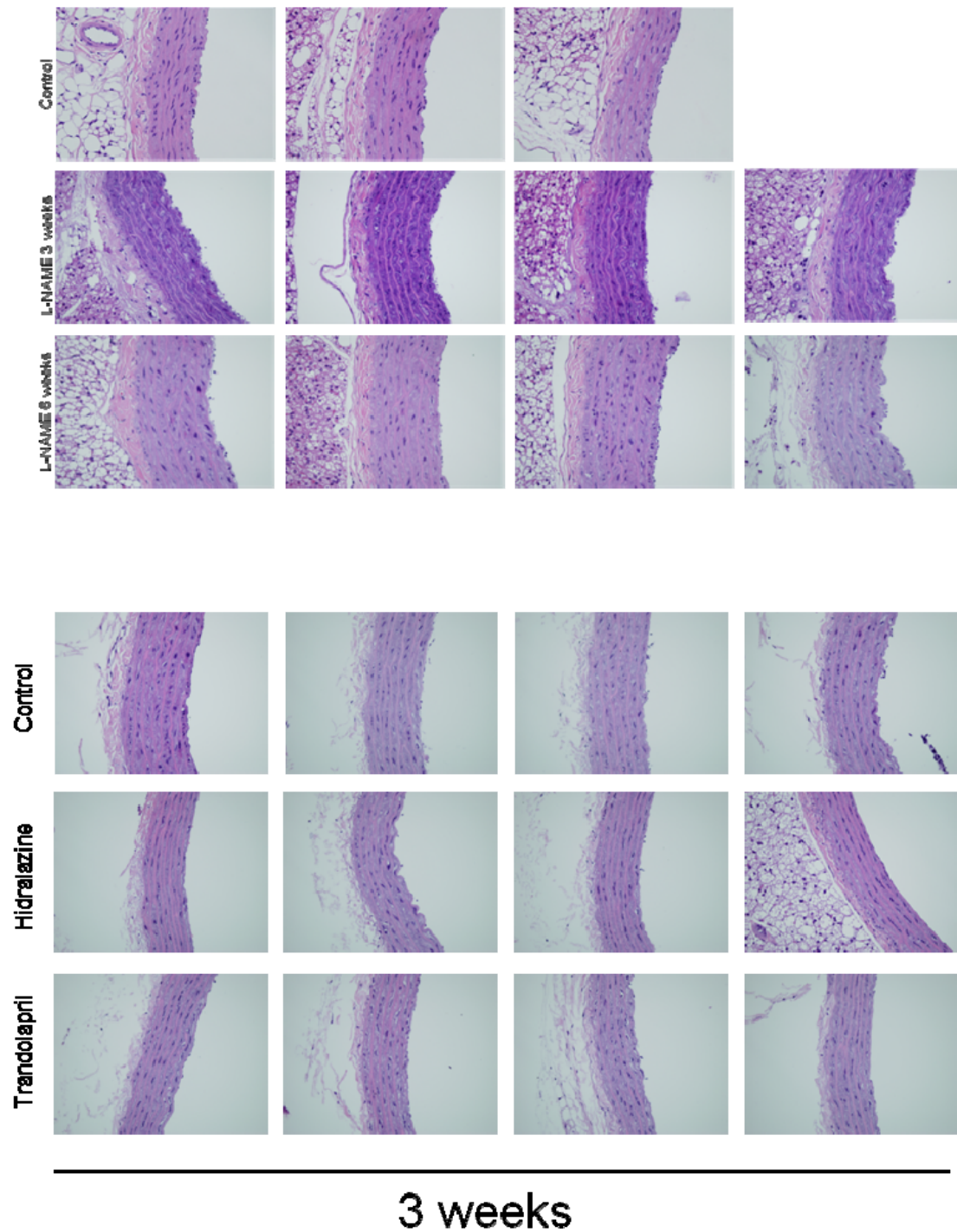
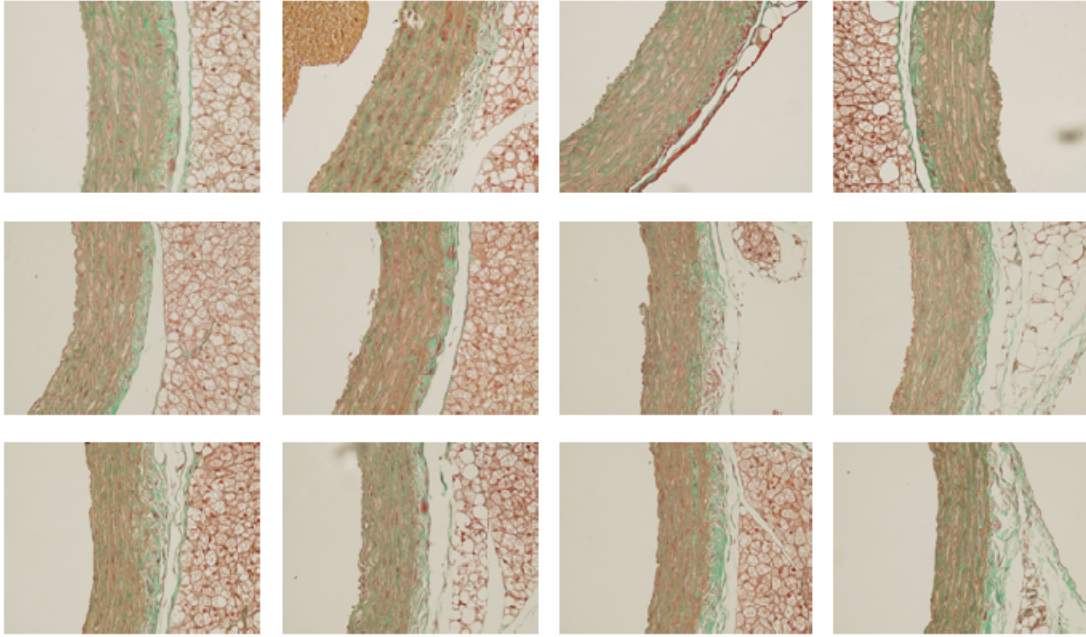


Figure 5





---

**6 weeks**

# DISCUSIÓN FINAL



Los avances en ciencias biosanitarias ocurren constantemente y muchos de ellos se están centrando, especialmente, en poder introducir en la práctica clínica nuevos biomarcadores capaces de facilitar el diagnóstico y la monitorización de las enfermedades. Los estudios de esta tesis doctoral se hacen eco de estas necesidades existentes en la sanidad actual y ha tratado de identificar nuevos marcadores para enfermedades con una gran prevalencia en el mundo e impacto en el coste sanitario como son la hipertensión y la diabetes y la muy común interacción que ocurre entre ellas, dando lugar a la comorbilidad que empeora la patogenia de ambas enfermedades.

Una muestra cómoda de utilizar en los centros sanitarios es, sin duda, la orina. Su comodidad reside, fundamentalmente, en ser un método no invasivo por lo que el paciente suele ser más receptivo a someterse a esta prueba. Muchas personas sufren fobia a someterse a técnicas invasivas, como por ejemplo la extracción de sangre (hematofobia), convirtiéndose las muestras de orina en un método positivamente valorado por la mayoría de los pacientes. La hematofobia es un tipo de fobia en la que la ansiedad viene definida por la presencia de conductas de evitación y/o escape de lugares, objetos y situaciones relacionadas con la visión de sangre, agujas y heridas, por el temor al desmayo y, en casos extremos, a la pérdida de conocimiento. Es la fobia específica más común dentro de los trastornos de ansiedad y en la población general (Borda, 2001 ; Kleinknecht, 1994).

Teniendo en cuenta que las enfermedades de estudio en esta tesis doctoral eran la hipertensión y la diabetes, hicimos grupos experimentales usando como modelo animal la rata. Usamos este animal para nuestros estudios debido, entre otras cosas, a que las ratas son fáciles de manejar, el gasto para su mantenimiento no es elevado, tienen una buena supervivencia tras complicados procesos quirúrgicos o la inducción de distintas enfermedades y además es un modelo que se asemeja altamente con el humano pudiendo extrapolar, en muchas ocasiones, los resultados obtenidos con el animal de experimentación al ser humano.

Una vez establecido el modelo animal decidimos los distintos grupos de estudio. Usamos ratas wistar como modelos de normotensión y ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas sometidas a reducción de masa renal como modelos de hipertensión. Las SHR han sido utilizadas durante mucho tiempo como modelo para

analizar diferentes aspectos de la hipertensión arterial, por la similitud con la hipertensión esencial del humano. Estas semejanzas incluyen la predisposición genética al desarrollo de hipertensión sin etiología específica, el incremento de la resistencia periférica total (RPT) sin expansión de volumen, y resultados similares en el tratamiento en los animales estudiados (Ennis y cols., 2008; Escudero y cols., 2009). A las ratas wistar y SHR se las inducía diabetes mediante la inyección intraperitoneal de estreptozotocina que provoca la muerte selectiva de las células beta del páncreas originando un rápido y muy significativo aumento en los niveles de glucosa, característico de la diabetes tipo 1. Con todo esto ya conseguimos tener los grupos experimentales necesarios para nuestros estudios que eran ratas normotensas e hipertensas, diabéticas y no diabéticas.

Mediante estudios de proteómica diferencial, técnica muy útil y fiable para la determinación de proteínas diferenciales entre distintas muestras, obtuvimos una proteína alterada en la orina de las ratas hipertensas que posteriormente fue identificada. Esta proteína era la KLK9 perteneciente a la familia de las kalikreinas. Las kalikreinas son serinas proteasas. En humanos existen 15 kalikreinas distintas codificadas por la familia de genes de la kalikreina del tejido humano. Se conoce que todas estas kalikreinas tienen funciones distintas y poseen un papel clave en muchos procesos fisiológicos y patológicos (Prezas y cols., 2006).

Establecimos otro modelo animal de hipertensión para observar si también aparecía aumentada esta proteína. Para ello a ratas wistar se le administraba NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) que inhibe la enzima óxido nítrico sintasa, dando lugar a una vasoconstricción reflejada en el aumento de la presión arterial sostenida. En este modelo de hipertensión aparecía la KLK9 en la orina después de 7 semanas de tratamiento lo que parece indicar que la aparición de esta KLK9 no es debida a un aumento inmediato de la presión arterial, sino que es como consecuencia a una hipertensión mantenida en el tiempo.

Por otro lado quisimos comprobar el valor de esta proteína para un posible uso de monitorización de la enfermedad. Para lograr este fin a las ratas hipertensas les suministramos en el agua de bebida fármacos antihipertensivos: hidralazina (vasodilatador directo) y trandolapril (inhibidor de la enzima de conversión de la

angiotensina) para convertirlas en ratas normotensas y poder observar que ocurre con la KLK9 urinaria. Solo en el modelo con trandolapril desaparece la KLK9 de la orina de estas ratas y esto demuestra un posible uso de esta kalikreina urinaria para monitorizar la hipertensión a lo largo del tiempo pudiéndose comprobar si la terapia antihipertensiva está siendo eficaz. El descenso únicamente con trandolapril puede ser debido a que sólo con este fármaco se conseguía disminuir los niveles de presión a valores normales (ya que con la hidralazina se producía un clara disminución de los niveles de presión arterial, pero ésta quedaba ligeramente aumentada respecto a los valores basales) o a que la aparición de esta kalikreina estuviera, de algún modo, asociado con el sistema renina-angiotensina.

El siguiente paso que decidimos afrontar en esta tesis fue intentar dilucidar de donde provenía esta KLK9 que aparecía en la orina. Hemos observado que la cantidad de esta proteína en los órganos de estudio es la misma en todos los modelos, que la expresión génica en el riñón y el corazón es la misma en todos los grupos experimentales, que parece ser que proviene del ultrafiltrado de la sangre, pero que sus niveles en plasma no varía. Así pues, todo parece indicar, que su aparición en la orina se debe a un manejo renal alterado de dicha proteína. A continuación quisimos analizar cual podía ser el mecanismo renal alterado que estaba involucrado en la aparición de esta kalikreina en la orina de las ratas hipertensas. El complejo transportador megalina-cubilina se ha demostrado que media en la reabsorción de una gran variedad de proteínas (Christensen y Birn, 2001), por lo que nosotros quisimos comprobar si este mecanismo estaba involucrado. Por otro parte, el tratamiento con maleato se ha demostrado que induce que se arroje o derrame la megalina a la orina perjudicándose la reabsorción mediada por el receptor de la megalina-cubilina (Bergeron, 1996) por lo que el maleato se usa normalmente en experimentación para inhibir la endocitosis mediada por megalina (Nagai, 2001). Al administrar maleato a través del circuito a las ratas, la KLK9 aparece rápidamente en orina pero poco después desaparece completamente de ella por lo que parece ser que el receptor de la megalina no es muy importante, ni el único implicado en la aparición de la KLK9 debiendo existir otros mecanismos que participan también en la alteración del manejo renal que debe ocurrir en las ratas hipertensas. Como control positivo de este experimento usamos la proteína activadora de gangliósido M2 (GM2AP) que sufre una endocitosis clara a través del

receptor de la megalina apareciendo en orina cierto tiempo después de la administración del maleato y manteniéndose esta aparición a lo largo del tiempo (Quiros y cols., 2010).

Los estudios histológicos realizados al finalizar el modelo experimental reflejan que no existe ningún tipo de alteración en el tejido renal de las ratas hipertensas y los estudios bioquímicos también corroboran este dato, pudiendo concluir que las ratas hipertensas poseen un riñón absolutamente normal durante todo el experimento, no habiéndose desarrollado ningún tipo de nefropatía asociada a la hipertensión, por lo que la aparición de la KLK9 no se asocia como un marcador de daño renal ya presente, pero puede que si tenga valor como un marcador temprano de posible daño nefropático hipertensivo en el futuro u de otro órgano.

Respecto al estudio del corazón observamos que en las ratas hipertensas y tratadas con L-NAME ocurría una clara hipertrofia cardíaca, que revertía con el uso de los antihipertensivos, especialmente con el trandolapril. Esta hipertrofia y posterior reversión a un tamaño normal del corazón iba en paralelo, es decir, coincidía en el tiempo, con la aparición y posterior desaparición de la KLK9 en orina, pudiendo ser esta kalikreina un submarcador de hipertrofia cardíaca. Se trata de un submarcador debido a que, actualmente, no hemos dilucidado la relación directa que pudiera existir entre la KLK9 urinaria y la hipertrofia cardíaca. Así mismo en el estudio de la aorta se pudo comprobar, como era de esperar, que existía un engrosamiento de la pared vascular en hipertensas también revertido con los antihipertensivos.

Como resumen podemos concluir que la KLK9 urinaria posee un claro valor diagnóstico de hipertensión y un posible uso para monitorizar dicha enfermedad, pudiendo ser una herramienta muy útil para el personal sanitario a la hora de observar la validez del tratamiento, pudiéndose ajustar sus parámetros no solo por los valores numéricos obtenidos con el esfigmomanómetro (con los típicos problemas que muy habitualmente aparecen asociados a esta técnica de medida como es el efecto de la bata blanca) sino también con la observación de esta proteína en la orina. Además esta kalikreina puede ser un marcador de algún tipo de daño hipertensivo ocurrido en algún órgano o de un futuro daño nefrológico debido a hipertensión o incluso, ser un submarcador de hipertrofia cardíaca, por lo que el abanico de posibilidades que puede

ofrecer en el futuro este marcador en clínica puede ser muy amplio y de una gran utilidad.

Por otro lado en esta tesis doctoral se quiso también abordar el estudio de la enfermedad de la diabetes y su bien conocida comorbilidad con la hipertensión. Para ello usamos las ratas wistar y las SHR con o sin diabetes mediante la inyección de la estreptozotocina. Una nueva generación de marcadores biológicos, la mayoría de ellos marcadores urinarios, se encuentran en vías de desarrollo para poder detectar tempranamente patologías renales como la insuficiencia renal aguda, algunos de estos nuevos biomarcadores son la lipocalina de neutrófilos asociada a la gelatinasa (NGAL), la molécula de daño renal 1 (KIM-1) o la interleucina 18 (IL-18) (Parikh y cols., 2006; Vaidya, 2008). Mediante western blot descubrimos que el NGAL aparecía solamente en las ratas hipertensas diabéticas.

Administramos L-NAME a las ratas wistar diabéticas para observar si en este nuevo modelo también encontrábamos NGAL urinario. Observamos que aparecía a las 7 semanas de tratamiento, pudiéndose concluir que este marcador de comorbilidad de la diabetes y la hipertensión aparecía después de sufrir una hipertensión sostenida a lo largo del tiempo y no de una inmediata subida de la presión arterial en un momento concreto.

La cantidad de NGAL en los tejidos estudiados y su expresión génica en el riñón no variaban, al igual que ocurría con la KLK9 urinaria, y en todos los demás estudios realizados, es decir, plasma y receptor de megalina, obtuvimos el mismo resultado que con la KLK9. Así que el NGAL también procede del ultrafiltrado de la sangre y su aparición en orina parece ser debido a un manejo renal alterado de esta proteína no mediada, solamente, por el receptor megalina-cubilina. Así mismo, los estudios histológicos renales y bioquímicos de función renal fueron normales por lo que podemos concluir que el sistema renal, aparentemente, se encuentra en perfecto estado.

En resumen, el NGAL posee un importante valor diagnóstico de esta comorbilidad, así como un posible valor de monitorización y de marcador temprano de daños en órganos diana de esta comorbilidad o de predisposición a posibles futuros daños.

El próximo paso a realizar, que se antoja fundamental, es validar todo lo estudiado en nuestros modelos de experimentación en ratas a los seres humanos, y para ello, lo primero sería conseguir la colaboración con centros sanitarios que nos proporcionaran muestras de pacientes normotensos e hipertensos, diabéticos y no diabéticos y analizar en sus orinas el NGAL y la KLK9.

En conjunto, el estudio de estas 2 proteínas aparecidas en muestras de orina nos demuestra la gran importancia que tiene esta muestra biológica y la necesidad de futuros estudios de nuevos biomarcadores que fueran introducidos en el día a día del trabajo realizado en la clínica y en los centros de salud. Lo ideal sería poder disponer de una gran batería de marcadores en orina que se analizaran sistemáticamente en cada prueba urinaria que se realizara y así, con el estudio de una sola muestra de orina se pudiera descartar a la vez muchas lesiones o enfermedades y, en sentido contrario, poder determinar las enfermedades o los posibles daños que pudiera padecer el paciente para poder atajarlos o minimizar los daños lo más tempranamente posible y poder, a lo largo del tiempo, seguir la evolución de las patologías a través de otras muestras de orinas recogidas cada cierto intervalo de tiempo. Además, también sería muy interesante poder utilizar los nuevos biomarcadores como herramientas útiles para monitorizar las enfermedades y así conseguir especificar un tipo de tratamiento concreto a cada paciente, convirtiéndose la sanidad en algo mucho más personificado y ajustado a cada individuo. Así pues, a través de la simple recogida de orina y su análisis, algo muy rutinario hoy en día en todos los centros sanitarios, en el futuro se puede llegar a disponer de muchísima información diagnóstica si las venideras investigaciones siguieran centradas y dando importancia a este campo de investigación tan provechoso y con tanto potencial.

# CONCLUSIONES

De los estudios expuestos en este trabajo de Tesis Doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La función y la histología renal de todas las ratas de los diferentes grupos experimentales es normal, no existiendo, aparentemente, nefropatía diabética ni hipertensiva.
2. La kalikreina 9 (KLK9) aparece en todos los modelos animales hipertensos, es decir, en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), en las ratas sometidas a reducción de masa renal y a las que se les administra L-NAME en el agua de bebida.
3. Esta aparición de la KLK9 urinaria no es debida a un aumento súbito de la presión arterial en un momento concreto, sino que es necesario que exista una hipertensión sostenida.
4. Solo con la administración del fármaco trandolapril, y no con la hidralazina, se consigue la desaparición completa de la KLK9 urinaria.
5. La hipertrofia cardiaca típica de la hipertensión se revierte con la administración del fármaco trandolapril, coincidiendo en el tiempo con la desaparición de la KLK9 urinaria, pudiendo tener valor esta kalikreina como submarcador de hipertrofia cardiaca.
6. La aparición de la KLK9 puede ser debida a un manejo renal alterado en el cuál el sistema de transporte megalina-cubilina no es el único implicado.
7. La lipocalina de neutrófilos asociada a la gelatinasa (NGAL) aparece, únicamente, en la orina de las ratas hipertensas diabéticas, siendo necesaria una hipertensión sostenida para su aparición.
8. La aparición del NGAL puede ser debida a un manejo renal alterado en el cuál el sistema de transporte megalina-cubilina no es el único implicado, al igual que ocurría con la KLK9 urinaria.



9. Ambas proteínas tienen valor diagnóstico y un posible uso futuro como marcadores para la monitorización de estas enfermedades y como marcadores tempranos de los daños asociados a estas patologías.

# BIBLIOGRAFÍA

- Alberti KGMM. Problems related to definitions and epidemiology of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: studies throughout the world. *Diabetologia*, 36:978-984. 1993.
- Amenábar J, García-López F, Robles NR, Sancho R. Informe anual del registro de pacientes en diálisis y trasplante renal en España. *Nefrología*, 20 (suppl. 6):34. 2000.
- American Academy of Family Physicians. <http://www.aafp.org/online/en/home/publications/news/newsnow/clinicalcaresearch/20090624a1c-diab-dx.html> (last access on February 28, 2010).
- American Diabetes Association. Clinical practise recommendations 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, (suppl. 1):S5-S20. 2003.
- American Diabetes Association. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 28 Suppl 1:S4-3. 2005.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 29 (suppl. 1):S43-S48. 2006.
- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The Prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 24(6):1069- 78. 2001.
- Armario P, Banegas JR, Campo C, Sierra A, Gorostidi M, Hernández R. Guía española de hipertensión arterial 2005. Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). *Hipertensión*, 22 Supl 2:47-57. 2005.
- Ascaso J. Diabetes mellitus y enfermedad cardiovascular. Biblioteca de la sociedad española de diabetes. Mayo ediciones. 2007.

- Banegas JR. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. *Hipertensión*, 22(9):353-62. 2005.
- Bayón C, Barriga MA, Litwak L. Incretinas, Incretinomiméticos, Inhibidores de DPP IV. *Rev Argent Endocrinol Metab*, 47: 36-51. 2010.
- Bergeron M, Mayers P, Brown D. Specific effect of maleate on an apical membrane glycoprotein (gp330) in proximal tubule of rat kidneys. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 271: F908–F916. 1996.
- Boletín Terapéutico Andaluz. Nuevos tratamientos para la diabetes mellitus tipo 2. ¿Qué aporta el efecto incretina? Volumen 25 nº 2. 2009.
- Borda M. Hematofobia: sincronía en el triple sistema de respuestas. *Revista de Psicopatología y Psicología Clínica*, Volumen 6. Número 3 pp. 179-196. 2001.
- Borhani NO, Mercuri M, Borhani PA, Buckalew VM, Canossa-Terris M, Carr AA, Kappagoda T, Rocco MV, Schnaper HW, Sowers JR, Bond MG. Final outcome results of the Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study (MIDAS). A randomized controlled trial. *JAMA*, 276: 785-91. 1996.
- Bosch J, Yusuf S, Pogue J, Sleight P, Lonn E, Rangoonwala B, Davies R, Ostergren J, Probstfield J. on behalf of the HOPE Investigators. Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomized trial. *BMJ*, 324:699-702. 2002.
- Burnier M, Brunner HR. Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet*, 355:637-45. 2000.
- Burns KD. Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney. *AM J Kidney Dis*, 36:449-467. 2000.

- Coca A, Domenech M, Sierra C. Aliskiren en la práctica clínica: eficacia y seguridad en monoterapia y en combinación. *Rev Esp Cardiol Supl*, 9:49A-59A. 2009.
- Cowley AW Jr. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev*, 72: 231-300. 1992.
- Cowley AW Jr, Mattson DL, Lu S, Roman RJ. The renal medulla in hypertension. *Hypertension*, 25: 663-73. 1995.
- Cowley AW Jr, Roman RJ. The role of the kidney in hypertension. *JAMA*, 275; 1581-9. 1996.
- Curb JD, Pressel SL, Cutler JA, Savage PJ, Applegate WB, Black H, Camel G, Davis BR, Frost PH, Gonzalez N, Guthrie G, Oberman A, Rutan GH, Stamler J. Effect of diuretic-based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension. Systolic Hypertension in the Elderly Program Cooperative Research Group. *JAMA*, 276:1886-92. 1996.
- Curtis L. New Technologies and therapies in the management of diabetes. *The American Journal of Managed Care*, 13: S47-S54. 2007.
- Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280: F562-F573. 2001.
- dfarmacia.com, portal dirigido a los profesionales de la farmacia: [http://www.dfarmacia.com/farma/ctl\\_servlet?\\_f=13&idContenido=13148967&idCategoria=4](http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=13&idContenido=13148967&idCategoria=4). Entrada: marzo, 2010.
- DiBona, GF. The sympathetic nervous system and hypertension. Recent developments. *Hypertension*, 43: 147-50. 2004.

- Diego B. *La epidemia de diabetes: suma y sigue*. Rev Esp Econ Salud, May-Jun, 2(3). 2003.
- Dunder K, Lind L, Zethelius B, Berglung L, Lithell H. Increase in blood glucose concentration during antihypertensive treatment as a predictor of myocardial infraction: population based cohort study. BMJ, 326:681-4. 2003.
- Edge L, Dagoga S. Epidemiology of type 2 Diabetes Focus and Ethnia Minorities. Med Clin N Am, 89: 949- 975. 2005.
- Egan BM, Zhao Y, Axon RN. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988--2008. JAMA, 303:2043-50. 2010.
- Ennis IL, Nolly MB, Pinilla OA, Garcarena1 CD, Carranza VB, Piaggio MR, Escudero EM, Cingolani HE. Physiologic cardiac hypertrophy: impact of its development upon a model of pathologic hypertrophy. Circulation, 117: 52. 2008.
- Escudero E, Pinilla O, Carranza V. Análisis ecocardiográfico de la geometría ventricular izquierda en ratas espontáneamente hipertensas. Medicina, Volumen 69, N° 3. 2009.
- European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension - European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. J Hypertens, 21:1011-5. 2003.
- Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L, Loscalzo J. Harrison. Principios de medicina interna. 17ª Ed.; Editorial McGraw-Hill, 2008.
- Fox KM; EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease:

- randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*, 362:782-8. 2003.
- Fuller JH. Hypertension and diabetes: epidemiologic aspects as a guide to management. *J Cardiovasc Pharmacol*, 21 (suppl. 2):S63-S66. 1993.
  - Gadsby R. Epidemiology of diabetes. *Advanced Drug Delivery Review*, 54: 1165-72. 2002.
  - Gil E, Zorrilla B, Ortiz H, Martínez M, Donoso E, Nogales P, Calle H, Medrano MJ, Cuadrado I. Prevalencia de diabetes mellitus y factores de riesgo cardiovascular en la población adulta de la Comunidad de Madrid: estudio PREDIMERC. *Gac Sanit*, 24(3):233-240. 2010.
  - Gilbert R, Phillips P, Clarke C, Jerums G. Day-night blood pressure variation in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic subjects. Dippers and non-dippers. *Diabetes Care*, 17:824-827. 1994.
  - Goday A. Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol*, 55:657-70. 2002.
  - Goligorski MS, Chen J, Brodsky S. Workshop: endotelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy. Focus on nitric oxide. *Hypertension*, 37:744-748. 2001.
  - Gomis R, Rovira A, Felú JE, Oyarzabal M. *Tratado SED de Diabetes Mellitus*. 1ª Ed.; Editorial Médica Panamericana, 2007.
  - Gorostidi M, Concejo B, Prieto MA, Marín R. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. Una revisión farmacoterapéutica. *Hipertensión*, 19:129-38. 2002.

- Grau M, Subirana I, Elosua R, Solanas P, Ramos R, Masiá R, Cordón F, Sala J, Juvinyà D, Cerezo C, Fitó M, Vila J, Covas MI, Marrugat J. Trends in cardiovascular risk factor prevalence (1995–2000–2005) in northeastern Spain. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 14:653–9. 2007.
- Guyton AC, Manning RD Jr, Hall JE, Norman RA Jr, Young DB, Pan YJ. The pathogenic role of the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*, 6 (Suppl 1): S151-61. 1984.
- Guyton AC. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autorregulation in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens*, 2: 575-85. 1989.
- Guyton AC. The surprising kidney-fluid mechanism for pressure control—its infinite gain!. *Hypertension*, 16: 725-30. 1990.
- Guyton AC. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 252:1813-6. 1991.
- Guyton AC, Hall J. *Tratado de Fisiología médica*. 11ª Ed.; Editorial Elsevier Saunders, 2006.
- Ha SK, Young LS, Su PH, Ho SJ, Jung KS, Hun KD, Rae KK, Yung LH, Suk HD. ACE DD genotype is more susceptible than ACE II and ID genotypes to the antiproteinuric effect of ACE inhibitors in patients with proteinuric non-insulin dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*, 15:1617-1623. 2000.
- Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmäki K, Dahlöf B, de Faire U, Mörlin C, Karlberg BE, Wester PO, Björck JE. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*, 353:611-6. 1999.



- Hansson L, Lindholm LH, Ekblom T, Dahlöf B, Lanke J, Scherstén B, Wester PO, Hedner T, de Faire U, for the STOP Hypertension-2 study group. Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension- 2 study. *Lancet*, 354:1751-6. 1999.
- Herando L. *Nefrología clínica*. 1ª Ed.; Editorial Médica Panamericana, 2004.
- Huang M, Hester RL, Coleman TG, Smith MJ, Guyton AC. Development of hypertension in animals with reduced total peripheral resistance. *Hypertension*, 20: 828-33. 1992a.
- Huang M, Hester RL, Guyton AC, Norman RA Jr. Hemodynamic studies in DOCA-salt hypertensive rats after opening of an arteriovenous fistula. *Am J Physiol*, 262: H1802-8. 1992b.
- Humphrey JD, Wilson E. A potential role of smooth muscle tone in early hypertension: a theoretical study. *J Biomech*, 36: 1595-601. 2003.
- Ingelfinger J. Ambulatory blood-pressure monitoring as a predictive tool. *N Engl J Med*, 347:778-779. 2002.
- IntraMed:<http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=47329&pagina=4>. Entrada: junio, 2007.
- Jeffcoate SL. *Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on*. *Diabet Med*, 21(7):657-65. 2004.
- Joseph T, Bonita E. Obesity Hypertension in Adolescents: Epidemiology, Evaluation, and Management. *The Journal of Clinical Hypertension*, May;13(5):323-31. 2011.

- Kaplan NM. Treatment of hypertension: drug therapy. En: Kaplan NM, editor. Clinical Hypertension. 7th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p. 181-263
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet, 365:217-23. 2005.
- Khattar A, Senior R, Leheri A. Cardiovascular outcome in White coat versus sustained mild hypertension: a ten-year follow-up study. Circulation, 98:1892. 1998.
- Kleinknecht RA. Acquisition of blood, injury and needle fears and phobias. Behaviour Research and Therapy, 32, 817-823. 1994.
- Lee JM, Wu EL, Tarini B, Herman WH, Yoon E. Diagnosis of Diabetes using Hemoglobin A1c: Should Recommendations in Adults Be Extrapolated to Adolescents?. J Pediatr, Jun;158(6):947-952.e3. 2011.
- Lind M, Odén A, Fahlén M, Eliasson B. *The true value of HbA1c as a predictor of diabetic complications: simulations of HbA1c variables*. PLoS One, 4(2):e4412. 2009.
- Lindeman RD, Romero LJ, Hundley R, Allen AS, Liang HC, Baumgartner RN, Koehler KM, Schade DS, Garry PJ. Prevalences of type 2 diabetes, the insulin resistance syndrome, and coronary heart disease in an elderly, biethnic population. Diabetes Care, 21 (6):959-966. 1998.
- Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S, for the LIFE study group. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. Lancet, 359:1004-10. 2002.

- Lindholm LH, Persson M, Alaupovic P, Carlberg B, Svensson A, Samuelsson O. Metabolic outcome during 1 year in newly detected hypertensives: results of the Antihypertensive Treatment and Lipid Profile in a North of Sweden Efficacy Evaluation (ALPINE study). *J Hypertens*, 21: 1563-74. 2003.
- Lithell H, Hansson L, Skogg I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A, for the SCOPE Study Group. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE). Principal results of a randomised double-blind intervention trial. *J Hypertens*, 21:875-86. 2003.
- Lohemeier TE, Hildebrandt DA, Warren S, May PJ, Cunningham JT. Recent insights into the interactions between the baroreflex and the kidneys in hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R828-36. 2005.
- López-Novoa JM. Función renal. En: RodésJ, Guardia J (eds). *Tratado de Medicina Interna*. Barcelona: Masson; 2004.
- López-Novoa JM, López-Hernández FJ. El riñón en el control de la presión arterial. *FMC: Nefrología e Hipertensión*, Vol.2 Núm.6. 2006.
- López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjeksus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors. *Eur Heart J*, 25:1454-70. 2004.
- Mazón P, González JR. Aliskiren: el futuro del manejo de la enfermedad cardiovascular y renal. Programa ASPIRE HIGHER y estudios AVOID, ALOFT y ALLAY. *Rev Esp Cardiol Supl*, 9:60A-73A. 2009.
- Morales PA, Mitchell BD, Valdez RA, Hazuda HP, Stern MP, Haffner SM. Incidence of NIDDM and impaired glucose tolerance in hypertensive subjects. *Diabetes*, 42:154-161. 1993.

- Mulvany MJ. Resistance vessel growth and remodelling: cause or consequence in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens*, 9: 479-85. 1995.
- Nagai J, Tanaka H, Nakanishi N, Murakami T, Takano M. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281: F337–F344. 2001.
- Nosadini R, Sambarato M, Thomaseth K. Role of hyperglycemia and insulin resistance in determining sodium retention in non-insulin-dependent diabetes. *Kidney Int*, 44:139-147. 1993.
- Ohlsson O, Henningsen NC. Blood pressure, cardiac output and systemic vascular resistance during rest, muscle work, cold pressure test and psychological stress. A study of male offspring from families with a history of essential hypertension for at least two generations. *Acta Med Scand*, 212: 329-36. 1982.
- Omvik P, Tarazi RC, Bravo EL. Regulation of sodium balance in hypertension. *Hypertension*, 2: 515-23. 1980.
- Palomo L, Rubio C, Gervás J. La comorbilidad en atención primaria. *Gac. Sanit*, 20 (supl 1):182-91. 2006.
- Papelbaum M. Comorbilidad psiquiátrica en la diabetes mellitus tipo 2: del diagnóstico al tratamiento. *Claves de diabetología. Suplemento de salud y ciencia. Sociedad iberoamericana de información científica*, Vol 4 N° 4. Agosto, 1-3. 2008.
- Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Edelstein CL, Devarajan P. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*, Jul;6(7):1639-45. 2006.

- Pepine CJ, Cooper-DeHoff RM. Cardiovascular therapies and risk for development of diabetes. *J Am Coll Cardiol*, 44:509-12. 2004.
- Pérez Marever M, Carrera MJ, Vinzia G, Micaló T, Gómez N, Sahún M, Soler J, Montanya E. Nefropatía diabética inicial y enfermedad cardiovascular en una población mediterránea: factores de riesgo y grado de tratamiento. *Rev Clin Esp*, 204:255-259. 2004.
- Pickering T, James G, Boddie C, Harshfiel GA, Blankk S, Laragh JH. How common in white coat hypertension?. *JAMA*, 259:225-228. 1988.
- Pinkney JH, Mohamed-Ali V, Denver AE, Foster C, Sampson MJ, Yudkin JS. Insulin resistance, insulin, proinsulin and ambulatory blood pressure in type II diabetes. *Hypertension*, 24:362-367. 1994.
- Prezas P, Arlt M, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis E, Krüger A, Magdolen V. Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol. Chem.*, Vol. 387, pp. 807–811. 2006.
- Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martínez SM, González-Buitrago JM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator proteín. *Kidney Int*, Nov;78(10):1006-15. 2010.
- Ramachandran A, Anelatha C, Latha E, Manoharan M, Vigia V. Impacts of urbanisation on the lifestyle and on the prevalence of diabetes in native Asian Indian population. *Diab Res Clin Pract*, 44 (3):207-213. 1999.
- Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37:1595-1607. 1988.

- Rigo CF, Frontera JG, Llobera CJ, Rodríguez T, Borrás I, Fuentespina E. Prevalencia de factores de riesgo cardío-vascular en las Islas Baleares (estudio CORSAIB). *Rev Esp Cardiol*, 58: 1411–1419. 2005.
- Robert A, Rourke O, Valentín F, Wayne A. Hurst el Corazón. Manual De Cardiología. 11ª Ed.; Editorial McGraw-Hill-Interamericana, 2007.
- Rodríguez-Miñón JL. La diabetes. Tres mil quinientos años de historia. Madrid: Editorial Nordisk, 1992.
- Ruggenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, Rubis N, Gherardi G, Arnoldi F, Ganeva M, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Bossi A, Trevisan R, Dodesini AR, Remuzzi G, for the Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 351: 1941-51. 2004.
- Salomaa VV, Strandberg TE, Vanhanen H, Naukkarinen V, Sarna S, Miettinen TA. Glucose tolerance and blood pressure: long term follow up in middle aged men. *Br Med J*, 302:493-496. 1991.
- Simon A, Garipey J, Moyse D, Levenson J. Differential effects of nifedipine and co-amilozide on the progression of early carotid wall changes. *Circulation*, 103:2949-54. 2001.
- Skov K, Mulvany MJ. Structure of renal afferent arterioles in the pathogenesis of hypertension. *Acta Physiol Scand*, 181: 397-405. 2004.
- Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial SEH-LELHA. Guía sobre el diagnóstico y el tratamiento de la hipertensión arterial en España 2002. *Hipertensión*, 19 Supl 3:1-74. 2002.
- Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhäger WH, Birkenhäger WH, Bulpitt CJ, de Leeuw PW, Dollery CT, Fletcher AE, Forette

- F, Leonetti G, Nachev C, O'Brien ET, Rosenfeld J, Rodicio JL, Tuomilehto J, Zanchetti A, for the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. *Lancet*, 350:757-64. 1997.
- Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular protection and blood pressure reduction: a meta-analysis. *Lancet*, 358:1305-15. 2001.
  - Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a quantitative overview updated until 1 March 2003. *J Hypertens*, 21:1055-7. 2003.
  - Sturrock N, George E, Pound N, Stevenson J, Peck G, Sowter H. Non-dipping circadian blood pressure and renal impairment are associated with increased mortality in diabetes mellitus. *Diabet Med*, 17:360-364. 2000.
  - Tamargo J. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Med Clin (Barc)*, 114 Suppl 1:S6-13. 2000.
  - The ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone. The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA*, 283:1967-75. 2000.
  - The Endocrine Society. <http://www.endosociety.org/advocacy/upload/TES-Statement-on-A1C-Use.pdf> (last access on February 28, 2010). The Endocrine Society. The Endocrine Society Statement on the use of A1C for diabetes diagnosis and risk estimation. 2010.

- The Hypertension in Diabetes Study Group. Hypertension in diabetes study (HDS): II. Increased risk of cardiovascular complications in hypertensive type 2 diabetic patients. *J Hypertens*, 111:319-325. 1993.
- The International Expert Committee. International Expert Committee Report on the Role of the A1c Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 32:1327-1334. 2009.
- Thrasher TN. Baroreceptors and the long-term control of blood pressure. *Exp Physiol*, 89: 331-41. 2004.
- Trevisan R, Vedovato M, Tiengo A. The epidemiology of diabetes mellitus. *Neprol Dial Transplant*, (suppl. 8):S2-S5. 1998.
- Trisán A, Menéndez H, Trisán A, Soto D, Suárez H. Retinopatía hipertensiva. *Medicina General*, 25:554-564. 2000.
- Tuomilehto J, Rastenyte D, Birkenhäger WH, Thijs L, Antikainen R, Bulpitt CJ, Fletcher AE, Forette F, Goldhaber A, Palatini P, Sarti C, Fagard R, for the Systolic Hypertension in Europe Trial Investigators. Effect of calcium-channel blockade in older patients with diabetes and systolic hypertension. *N Engl J Med*, 340:677-84. 1999.
- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48: 463–493. 2008.
- Valverde JC, Tormo MJ, Navarro C, Rodríguez-Barranco M, Marco R, Egea JM, Pérez-Flores D, Ortolá JB, González-Sicilia L, Tébar J, Sánchez-Pinilla M, Flores M, Cava J. Prevalence of diabetes in Murcia (Spain): a Mediterranean area characterised by obesity. *Diabetes Res Clin Pract*, 71:202–9. 2006.



- Vega T, Alamo R, Lleras S, et al. Riesgo de enfermedad cardiovascular en Castilla y León. Valladolid: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. 2005.
- Vega T, Lozano J, Álamo R, Lleras S. Prevalencia de la hipertensión arterial en la población de Castilla y León. Gac Sanit v.22 n.4. 2008.
- Velázquez MO, Lara EA, Martínez MM. La detección como instrumento para vincular la prevención primaria y la vigilancia epidemiológica de los factores de riesgo. Diabetes hoy, 22: 300-308. 2000.
- Verdecchia P, Reboldi G, Angeli F, Borgioni C, Gattobigio R, Filippuci L, Norgiolini S, Bracco C, Porcellati C. Adverse prognostic significance of new diabetes in treated hypertensive subjects. Hypertension, 43:963-9. 2004.
- Viberti G, Wheeldon NM; for the MicroAlbuminuria Reduction with Valsartan (MARVAL) Study Investigators. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus. A blood pressure-independent effect. Circulation, 106:672-8. 2002.
- Watts GF, Lewis B, Brunt JN, Lewis ES, Coltart DJ, Smith LD, Mann JI, Swan AV. Effects on coronary artery disease of lipid-lowering diet, or diet plus cholestyramine, in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). Lancet, 339:563-9. 1992.
- Wiegmann T, Herron K, Chonko A, Mac Dougall M, Moore M. Recognition of hypertension and abnormal blood pressure burden with ambulatory blood pressure recordings in type 1 diabetes mellitus. Diabetes, 39:1556-1560. 1990.
- Wing LM, Reid CM, Ryan P, Beilin LJ, Brown MA, Jennings GL, Johnston CI, McNeil JJ, Macdonald GJ, Marley JE, Morgan TO, West MJ, for the Second Australian National Blood Pressure Study Group. A comparison of outcomes

- with angiotensin-converting-enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly. *N Engl J Med*, 348:583-92. 2003.
- Wolf G, Chen S, Han DC, Ziyadeh FN. Leptin and renal disease. *Am J Kidney Dis*, 39: 1-11. 2002.
  - World Health Organization-International Society of Hypertension. Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens*, 17: 151-83. 1999.
  - Yoon SS, Ostchega Y, Louis T. Recent trends in the prevalence of high blood pressure and its treatment and control, 1999--2008. Hyattsville, MD: US Department of Health and Human Services, CDC, National Center for Health Statistics; NCHS Data Brief no. 48. 2010.
  - Yue DK, McLennan S, Church DB, Turtle JR. The measurement of glycosylated hemoglobin in man and animals by aminophenylboronic acid affinity chromatography. *Diabetes*, Aug;31(8 Pt 1):701-5. 1982.
  - Zamudio-Villarreal JF. Diagnóstico de diabetes con hemoglobina glicosilada. *Rev Eviden Invest Clin*, 3 (1): 58-60. 2010.
  - Zanchetti A, Agabiti-Rosei E, Dal Palu C, Leonetti G, Magnani B, Pessina A. The Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study (VHAS): results of long-term randomized treatment with either verapamil or chlorthalidone on carotid intima-media thickness. *J Hypertens*, 16:1667-76. 1998.
  - Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancia G, Dal Palu C, Dal Palù C, Hansson L, Magnani B, Rahn KH, Reid JL, Rodicio J, Safar M, Eckes L, Rizzini P, for the European Lacidipine Study on Atherosclerosis investigators. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on

Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation*, 106:2422-7. 2002.

- Zimmet PZ, McCarty DJ, De Courten MP. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J Diabetes Complications*, 11 (2):60-68. 1997.