



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FISIOPATOLOGÍA
DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL**

JORGE ARENAS GUERRERO

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario Departamento de
Ciencias Biológicas Animales.

PROFESOR GUIA: Prof. Dr. RAMÓN RODRIGO SALINAS

SANTIAGO, CHILE
2006

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FISIOPATOLOGÍA
DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL**

JORGE ARENAS GUERRERO

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario Departamento de
Ciencias Biológicas Animales.

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: RAMÓN RODRIGO SALINAS
PROFESOR CONSEJERO	: EMA GONZALEZ ZAMORA
PROFESOR CONSEJERO	: GUSTAVO FARIAS ROLDÁN

SANTIAGO, CHILE
2006

ÍNDICE	página
RESUMEN	
SUMMARY	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Características de la hipertensión arterial.....	3
2.2 Etiología de la Hipertensión arterial.....	5
2.2.1 Obesidad.....	6
2.2.2 Alcohol.....	6
2.2.3 Ingesta de sal.....	7
2.3 Patogenia de la hipertensión arterial esencial.....	8
2.3.1 Alteraciones de la membrana celular.....	8
2.4 Endotelio vascular.....	9
2.4.1 Disfunción endotelial.....	10
2.4.1.1 Óxido nítrico.....	10
2.4.1.2 Endotelina-1.....	12
2.4.2. Otros marcadores de disfunción endotelial.....	13
2.5 Radicales libres.....	14
2.6 Defensas antioxidantes.....	17
2.6.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	17
2.6.2 Catalasa (CAT).....	18
2.6.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px).....	19
2.6.4 Sustancias o moléculas antioxidantes.....	20
2.7 Estrés oxidativo en hipertensión.....	21
2.7.1 F ₂ -isoprostanos.....	22
2.7.2 Anión superóxido.....	23
2.7.3 Peroxinitrito.....	24
2.7.4 Angiotensina II.....	24
2.7.5 Homocisteína.....	25
2.8 Daño Sobre Biomoléculas.....	26
2.8.1 Lipoperoxidación.....	26

3. HIPÓTESIS.	28
4. OBJETIVOS.	28
4.1 Objetivo General.	28
4.2 Objetivos Específicos.	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
5.1 Diseño del protocolo de estudio de los pacientes:	29
5.1.1 Selección de pacientes hipertensos	29
5.1.2 Selección de controles sanos.	29
5.1.3 Condiciones de los pacientes para la obtención de la muestra.	29
5.2 Procesamiento de la muestra.	29
5.3 Evaluación de los parámetros relacionados con estrés oxidativo.	30
5.3.1 Capacidad antioxidante total del plasma (FRAP).	30
5.3.2 Actividad de enzimas antioxidantes en hemolizado de eritrocitos:	31
5.3.2.1 Catalasa (CAT).	31
5.3.2.2 Superóxido dismutasa (SOD).	32
5.3.2.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px).	33
5.3.3 Relación GSH/GSSG en hemolizado de eritrocitos:	35
5.3.4 Lipoperoxidación:	36
5.3.4.1 Niveles plasmáticos de F ₂ -isoprostanos.	36
5.3.4.2 Niveles de malondialdehído (MDA) en eritrocitos.	36
5.3.5 Determinación de hemoglobina en el glóbulo rojo.	38
5.4 Análisis estadístico.	38
5.4.1 Determinación del tamaño muestral.	38
5.4.2 Análisis de datos.	38
6. RESULTADOS.	39
6.1 Características de los pacientes.	39
Cuadro 1: Características clínicas de sujetos controles V/S pacientes hipertensos esenciales.	41
6.2 Biomarcadores de defensas antioxidantes.	42
6.2.1 Plasmáticos.	42
6.2.2 Eritrocitos.	43

6.3 Biomarcadores de estrés oxidativo: lipoperoxidación.....	46
6.3.1 Plasmáticos.....	46
6.3.2 Eritrocitarios.....	47
Cuadro 2: Parámetros bioquímicos de defensas antioxidantes y estrés oxidativo medidos en plasma y sangre de sujetos controles y pacientes con HTA.	48
6.4 Correlaciones establecidas entre presión arterial y defensas antioxidantes para el grupo HTA.	49
6.4.1 Plasmáticas.	49
6.4.2 Eritrocitarias.	50
6.5 Correlaciones establecidas entre presión arterial y biomarcadores de estrés oxidativo para el grupo HTA: Lipoperoxidación.	51
6.5.1 Plasmáticos.....	51
6.5.2 Eritrocitarios.....	51
7. DISCUSIÓN.	53
8. CONCLUSIONES.	57
9. BIBLIOGRAFÍA.	58

RESUMEN.

El mecanismo que explicaría la fisiopatología de la hipertensión arterial esencial se ha vinculado con la presencia de estrés oxidativo, el que se manifestaría con disfunción endotelial y daño sobre biomoléculas.

El objetivo de esta memoria fue medir parámetros bioquímicos de defensas antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo en plasma y eritrocitos de pacientes hipertensos esenciales comparados con controles sanos, con el fin de poder correlacionar estos datos con la presentación de hipertensión arterial esencial.

Se realizó un estudio de carácter prospectivo o longitudinal tipo cohorte, consistente en seleccionar pacientes hipertensos esenciales, sexo masculino, entre 30 y 65 años de edad, a los cuales se les aplicó una evaluación clínica estandarizada. Por cada paciente hipertenso seleccionado se incorporó al protocolo de estudio un control sano, normotenso, del mismo rango de edad. A un grupo de 31 pacientes hipertensos esenciales y 35 sujetos normotensos se les tomo muestra de sangre y plasma una vez cumplida su evaluación clínica.

Para evaluar los niveles de defensas antioxidantes a nivel plasmático se midió la capacidad antioxidante del plasma (FRAP, ferric reducing ability of plasma) y a nivel del eritrocito se midió la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), y la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG). La evaluación de estrés oxidativo se realizó mediante los índices de lipoperoxidacion medidos en plasma (F₂-isoprostanos) y en el eritrocito (MDA, malondialdehido).

Los pacientes hipertensos esenciales respecto a los sujetos controles presentaron valores menores de FRAP en plasma y actividad enzimática de SOD, CAT Y GSH-Px en el eritrocito, mostrando diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.001$). Para el caso de la relación GSH/GSSG medida en el eritrocito, pese a que se encontró disminuida en pacientes hipertensos respecto a los controles, esta no presentó diferencia significativa ($p = 0.403$). Por otra parte, los índices de lipoperoxidación se encontraron incrementados en pacientes hipertensos respecto a los controles, tanto para la medición de F₂-isoprostanos plasmáticos, como para la concentración de MDA a nivel eritrocitario, mostrando diferencia significativa para ambos grupos ($p < 0.001$). Los valores obtenidos para defensas

antioxidantes medidos en plasma y eritrocito, se correlacionaron negativamente con las cifras de presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD), y los valores obtenidos en los biomarcadores de lipoperoxidación se correlacionaron positivamente con las cifras de PAS y PAD.

Estos resultados permiten reafirmar la contribución que tiene el estrés oxidativo en el desarrollo de hipertensión arterial esencial humana, lo que permitiría establecer las bases para instaurar un tratamiento antioxidante en aquellos pacientes portadores de esta patología con la finalidad de atenuar los efectos producidos por los radicales libres, y como beneficio adjunto la prevención de otras enfermedades crónicas mediadas por estrés oxidativo.

SUMMARY.

The mechanism that would explain the physiopathology of arterial hypertension has been linked with the occurrence of oxidative stress, which would manifest itself in endothelial dysfunction and biomolecule damage.

The objective of this thesis was to measure biochemical parameters of antioxidant defense and biomarkers of oxidative stress in plasma and erythrocytes of essential hypertensive patients as compared to sound controls in order to correlate these data with the occurrence of essential arterial hypertension.

For this purpose, a longitudinal cohort-type survey was carried out, involving essential hypertensive, 30 to 65 year-old, male patients to which a standardized clinical evaluation was applied. For each selected hypertensive patient a sound normotensive control of the same age-range was included in the study protocol. A group of 31 essential hypertensive patients and 35 normotensive subjects were blood and plasma tested after being clinically evaluated.

To evaluate antioxidant defense levels at plasmatic level, the ferric reducing ability of plasma (FRAP) was measured. At erythrocyte level, the enzymatic activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathion peroxidase (GSH-Px), as well as the ratio of reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG), were measured. Evaluation of oxidative stress was carried out by means of lipoperoxidation indices measured in plasma (F2-isoprostanes) and in erythrocyte (malondialdehyde, MDA).

Essential hypertensive patients showed lower FRAP values and enzymatic activity of SOD, CAT and GSH-Px erythrocyte than the control subjects with significant differences with respect to the latter ($p < 0.001$). The ratio GSH/GSSG as measured in the erythrocyte, in spite of appearing decreased in hypertensive patients with respect to the controls, did not show significant difference ($p = 0.403$). On the other hand, lipoperoxidation indices were higher in hypertensive than in the control subjects, both in the measurement of plasma F2-isoprostanes and for the MDA concentration at erythrocyte level, showing significant differences for both groups ($p < 0.001$). Values obtained for antioxidant defense as measured in plasma and erythrocyte correlated negatively with figures of systolic and distolic arterial pressure (SAP and DAP), while values obtained in lipoperoxidation biomarkers correlated positively with SAP and DAP figures.

These results confirm the contribution of oxidation stress to human essential arterial hypertension, which would allow to establish the bases for antioxidant treatment in those patients affected by this condition so as to lessen the effects caused by free radicals and, as a concurrent benefit, to prevent other chronic diseases resulting from oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN.

La hipertensión arterial (HTA) es una alteración de la presión arterial que alcanza cifras sobre 140 mm Hg., para la presión sistólica, y sobre 90 mm Hg., para la diastólica. Es una de las enfermedades más comunes que afecta al ser humano y constituye un problema de salud pública debido a la morbilidad y mortalidad con que se le asocia. Existen causas identificables a las cuales se asocia la HTA tales como: enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal, tabaquismo, diabetes, entre otras, las que constituyen un bajo porcentaje en la forma habitual de presentación de esta enfermedad. En cambio, la hipertensión arterial esencial, cuyo mecanismo fisiopatológico se desconoce, ha sido registrada en el 95% de los casos.

Diversos estudios clínicos y experimentales recientes le han asignado importancia al estrés oxidativo en la génesis de la HTA, ya que el aumento de radicales libres puede afectar la estructura y función de la pared vascular, efecto que se traduce en la elevación de la presión arterial en forma crónica. En la HTA esencial se produce en forma primaria, una alteración de la función vasodilatadora del endotelio. Este efecto puede obedecer tanto a factores genéticos como ambientales; pero además, la misma elevación de la presión arterial puede contribuir a generar disfunción endotelial. El endotelio tiene un papel clave en la regulación del tono vascular, ya que sintetiza y libera un espectro de sustancias vasoactivas vasoconstrictoras como la endotelina, y vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), las cuales deben mantener un balance finamente regulado.

En consecuencia, el estrés oxidativo altera la respuesta vasomotora de la pared vascular, disminuyendo la efectividad vasodilatadora a agentes como acetilcolina o *shear* estrés, o bien exacerbando el efecto de los vasoconstrictores.

Diversas propiedades de los radicales libres permiten dar explicación a estos hallazgos. De esta manera, el aumento en la producción o una menor depuración de anión superóxido causa una inactivación del NO, sustancia vasodilatadora con la que reacciona para formar peroxinitrito. A su vez, el peroxinitrito tiene un efecto peroxidante sobre el ácido araquidónico que conduce a la formación de F₂-isoprostanos, agente vasoconstrictor que actúa como mediador del aumento de la producción de endotelina-1 (ET-1).

En la actualidad se cuenta con métodos que permiten evaluar *in vivo* la participación del estrés oxidativo en diversas patologías humanas, en forma no invasiva, como la medición de niveles de F₂-isoprostanos y la capacidad antioxidante del plasma.

Esto permite realizar un seguimiento de la eficacia de los tratamientos aplicados.

La realización de la presente memoria permitirá conocer la contribución del estrés oxidativo en el mecanismo de la HTA esencial.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de la hipertensión arterial

En la actualidad la hipertensión arterial es el mayor problema de salud a nivel mundial. Está presente en el 60 a 70% de la población mayor de 60 años de edad y puede llevar a complicaciones cardiovasculares tales como derrame cerebral, enfermedad cardíaca coronaria e insuficiencia cardíaca (Kashyap *et al.*, 2005). La prevalencia mundial estimada para hipertensión puede ser a lo menos 1 billón de individuos, y aproximadamente se registran 7.1 millones de muertes por año atribuibles a hipertensión arterial (Chobanian *et al.*, 2003).

La presión sanguínea elevada (hipertensión arterial) es definida como un aumento por sobre 140 mm Hg para la presión sistólica y sobre 90 mm Hg para la presión diastólica. Pacientes con presión sistólica entre 120 a 139 mm Hg, o diastólica entre 80 a 89 mm Hg son considerados “pre-hipertensos” y necesitan monitoreo médico y cambios en su estilo de vida (Chobanian *et al.*, 2003).

La hipertensión es un problema cada vez más importante en salud pública. El punto hacia donde más se detecta como edad media es entre los 60 a 69 años y aproximadamente la edad del 75% de los afectados está en 70 años o más (Chobanian *et al.*, 2003). Por lo tanto, existe un incremento en la incidencia y prevalencia de hipertensión con el incremento de la edad.

La hipertensión parece tener un componente genético y muchas personas pueden estar genéticamente predispuestas a tener hipertensión. Sin embargo, aunque esta alteración se presenta en algunas familias, esta base genética se comparte también con el estilo de vida que se lleva. Factores del estilo de vida, tales como: obesidad (particularmente abdominal), sedentarismo, hábito de fumar y alto consumo de alcohol están asociados con un aumento en el riesgo de sufrir hipertensión (Krousel-Wood *et al.*, 2004).

Hay diferentes causas de hipertensión, algunas de estas incluyen: tono muscular excesivo en las arterias, pérdida de la elasticidad de las arterias, formación de placas en el interior de las arterias, disfunción renal, anormalidades en la retención de sodio y agua que produce otro tipo de falla renal, y estrés (Mahmud y Feely, 2005).

La probabilidad para el desarrollo de varias enfermedades cardiovasculares aumenta con un incremento de la presión sanguínea. Evidencias experimentales implican al estrés

oxidativo desempeñando un importante papel en el aumento de presión sanguínea en modelos animales (Nakazono *et al.*, 1991).

El estrés oxidativo es un fenómeno que puede resultar de una depleción de antioxidantes en el organismo debido a causas nutricionales o debido a una excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (EROS), que facilitan la patogenia de diversas enfermedades (Kashyap *et al.*, 2005).

Por lo tanto, el sistema antioxidante exógeno y endógeno del organismo juega un papel principal en la prevención y limitación del daño oxidativo. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) corresponden a antioxidantes endógenos del organismo. Por otra parte, muchos de los antioxidantes exógenos como polifenoles, vitaminas A, C y E pueden ser suplementados en la dieta.

Numerosas enfermedades están relacionadas con estrés oxidativo y producción de radicales libres. Los radicales libres inducen injuria que tiene implicancia en el desarrollo de un número de enfermedades cardiacas tales como infarto al miocardio, algunas formas de cardiomiopatía, arritmias e hipertensión esencial (Singhal *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que la liberación de radicales libres podría ser estimulada por hipertensión aguda y este incremento en radicales libres posibilitaría el daño vascular que puede ser visto en sujetos hipertensos (Kashyap *et al.*, 2005).

Un incremento en los radicales libres resultaría en una disminución de la vasodilatación en arteriolas aisladas sujetas a una alta presión intravascular, sugiriendo el compromiso por parte de radicales libres en la elevación del *shear* estrés y resistencia periférica en la pared.

Así la baja concentración de antioxidantes, vitaminas, enzimas y una alta concentración de lipoperóxidos puede llevar a un incremento en el riesgo de enfermedad cardiaca coronaria.

Ensayos con agentes antihipertensivos muestran que casi siempre son requeridas más de 2 drogas para un control óptimo de la presión sanguínea (Brown, 2003). Por lo tanto nuevas estrategias para bajar la hipertensión e identificar pacientes con alto riesgo de sufrir complicaciones puede tener un alto impacto benéfico en salud pública (Ferroni *et al.*, 2006).

Una intervención farmacológica y cambios en el estilo de vida son recomendables para disminuir la presión sanguínea, pero una intervención en el estilo de vida puede tener menos efectos adversos que el uso de drogas.

Un estudio realizó intervenciones dietéticas como: reducción de calorías, reducción de sodio y aumento de potasio. Otras intervenciones fueron combinar pérdida de peso, realización de ejercicio y relajación (Nicolson *et al.*, 2004). Con estas intervenciones dietéticas realizadas se pueden obtener disminuciones en las cifras de colesterol, con lo que se puede disminuir el riesgo de morbilidad y mortalidad de enfermedades cardiovasculares independientemente de algún cambio en la presión sanguínea. Así una dieta saludable puede reducir, retrasar o eliminar el uso de drogas por periodo prolongados en algunos pacientes (Nicolson *et al.*, 2004).

2.2 Etiología de la Hipertensión arterial.

La presión arterial (PA) resulta de la interacción entre factores genéticos y factores ambientales. En algunos individuos predomina el factor genético, mientras que en otros los factores ambientales. El 95% de las hipertensiones que se observan en la clínica no tienen una etiología definida, constituyen la llamada hipertensión arterial esencial, también denominada primaria o idiopática, mientras que el 5% son secundarias a diversas causas entre las que destacan por su frecuencia las inducidas por drogas o fármacos, la enfermedad cardiovascular, renovascular, la falla renal, el feocromocitoma y el hiperaldosteronismo (Maicas *et al.*, 2003).

La hipertensión arterial esencial es un desorden heterogéneo, que puede presentar considerables variaciones en la participación de los factores causales en diferentes períodos y estadios, y en diferentes individuos. La interacción entre variaciones genéticas y factores ambientales tales como el estrés, la dieta y la actividad física, contribuyen al desarrollo de la hipertensión arterial esencial.

Esta interacción origina los denominados fenotipos intermedios, mecanismos que determinan el fenotipo final de hipertensión arterial a través del gasto cardíaco y la resistencia vascular total. Los fenotipos intermedios incluyen, entre otros: el sistema nervioso autónomo, el sistema renina-angiotensina, factores endoteliales, hormonas vasopresoras y vasodepresoras y volumen de líquido corporal.

La historia familiar de hipertensión predice de forma significativa el padecimiento futuro de esta patología en miembros de esa familia. La fuerza de predicción depende de la

definición de historia familiar positiva, del sexo y la edad de la persona en riesgo: es mayor el riesgo de padecerla cuantos más familiares de primer grado la presenten, cuando la presentaron a edad más temprana, cuanto más joven es el sujeto en riesgo, y para la misma definición y edad siempre es mayor en las mujeres (Maicas *et al.*, 2003)

Los estudios de familias han indicado que menos de la mitad de las variaciones de la presión arterial en la población general son explicadas por factores genéticos.

Se han descrito los siguientes factores hipertensinogénicos relacionados con estrés oxidativo:

1. Obesidad.
2. Ingesta elevada de alcohol.
3. Ingesta elevada de sal en pacientes sensibles a la sal.

Muchos de estos factores son aditivos, tal como ocurre con la obesidad y la ingesta de alcohol.

2.2.1 Obesidad.

La obesidad ha sido ampliamente reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de HTA. Es común en todas las sociedades desarrolladas y ha sido observada con una alta frecuencia entre niños.

Es sabido, que el aumento de la grasa abdominal, se asocia con peores consecuencias metabólicas y se ha relacionado con la dislipidemia, la diabetes mellitus (DM) tipo II y con la HTA. El mecanismo por el cual la obesidad y la distribución de la grasa a nivel abdominal provocan un mayor riesgo de HTA aún se desconoce. Se ha observado que la pérdida de peso se correlaciona con una disminución de las cifras de presión arterial (Maicas *et al.*, 2003)

2.2.2 Alcohol.

En las pasadas dos décadas, los estudios epidemiológicos han establecido una relación entre el consumo de alcohol y la HTA, en ambos sexos y para todos los tipos de bebidas alcohólicas (Rayo y Marín, 1999). Estudios randomizados muestran que la reducción del consumo de alcohol disminuye los niveles de PA en pacientes hipertensos en tratamiento farmacológico como en aquellos que no reciben tratamiento (Beilin *et al.*, 1996). El consumo excesivo de alcohol debe ser considerado como un posible factor de riesgo para la HTA. Se han descrito varios posibles mecanismos por los que el alcohol media su efecto en la PA:

- Aumento de los niveles de renina-angiotensina y/o de cortisol.
- Efecto directo sobre el tono vascular periférico, probablemente a través de interacciones con el transporte del calcio.
- Alteración de la sensibilidad a la insulina.
- Estimulación del Sistema Nervioso Central.
- Depleción de magnesio que podría provocar vasoespasmo e HTA.

El consumo excesivo de alcohol se relaciona con aumento de la PA, así como con arritmias cardíacas, miocardiopatía dilatada y accidentes cardiovasculares (ACV) hemorrágicos.

2.2.3 Ingesta de sal.

El aporte excesivo de Na induce hipertensión por aumento del volumen sanguíneo y de la precarga, lo cual eleva el gasto cardíaco. También puede aumentar la PA mediante otros mecanismos. La asociación positiva entre aporte de sal e hipertensión arterial está avalada por datos epidemiológicos como la ausencia de HTA en individuos que tienen baja ingesta de sodio, la aparición de hipertensión en determinados individuos que adoptan un estilo de vida moderno que incluye mayor aporte de sodio y estudios comparativos entre diferentes países como el estudio INTERSALT (Cooperative Research Group, 1988). En este estudio, realizado en 52 centros de diversos países, se relacionó la excreción de sodio ajustada por el peso corporal con la pendiente de los niveles de PA diastólica con la edad. En los países con mayor consumo de sodio la pendiente es mayor, indicando la relación entre ambos parámetros, ingesta de sal y PA diastólica.

Se encontraron también estudios experimentales en animales a favor de la participación del exceso de Na en la aparición de HTA, tales como el incremento de la PA en chimpancés genéticamente predispuestos con el aumento progresivo de Na en la dieta (Maicas *et al.*, 2003).

En el ensayo DASH de restricción de Na y aumento de potasio (K) se observó un pequeño efecto de la restricción de sal independiente de los cambios en la ingesta calórica y de potasio.

Son predictores clínicos de sensibilidad a la sal: obesidad, edad avanzada, raza negra, niveles bajos de renina plasmática, actividad incrementada del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y presencia de enfermedades concomitantes tales como insulino-resistencia/diabetes mellitus (DM), insuficiencia renal y microalbuminuria.

Se han propuesto diferentes mecanismos de sensibilidad al Na:

- Defecto en la excreción renal de Na: Vasoconstricción renal y mayores índices de reabsorción proximal de Na.
- Aumento de la actividad del intercambiador de Na e hidrogeniones en el túbulo proximal.
- Mayor nivel de actividad del SNS y mayor reactividad presora que la normal.
- Disfunción endotelial por disminución de la respuesta del óxido nítrico (NO) a cargas de Na.

La sensibilidad a la sal en normotensos se asocia con un aumento del riesgo para el desarrollo de hipertensión, eventos cardiovasculares y muerte (Maicas *et al.*, 2003)

2.3 Patogenia de la hipertensión arterial esencial.

2.3.1 Alteraciones de la membrana celular.

Se han descrito alteraciones en las propiedades físicas de la membrana celular y de los sistemas de transporte en la patogenia de la HTA.

Transporte iónico a través de las membranas:

- Na⁺ intracelular: La mayoría de las determinaciones de Na⁺ intracelular han encontrado concentraciones más elevadas en células de individuos hipertensos en relación con las concentraciones halladas en pacientes normotensos.
- Intercambio Sodio-Hidrógeno (Na⁺-H⁺): El cotransporte Na⁺-H⁺ intercambia H⁺ intracelulares por Na⁺ extracelular, resultando fundamental para la regulación del pH y de la volemia. El aumento de la actividad de este intercambiador podría estar implicado en la patogenia de la HTA, estimulando el tono vascular y el crecimiento de células musculares lisas, y probablemente, aumente la reabsorción de Na⁺ a nivel renal.

Se ha descrito que las membranas celulares de los pacientes hipertensos presentan alteraciones en la composición de los lípidos, que determina un aumento de la viscosidad y una menor fluidez de la membrana que puede ser responsable de variaciones en la permeabilidad a determinados iones.

- Transporte y fijación de Ca²⁺: Se ha encontrado en pacientes hipertensos un mayor contenido de Ca²⁺ en las membranas celulares, comparado con individuos con PA normal.

2.4 Endotelio vascular.

El endotelio es el recubrimiento interior de los vasos sanguíneos (arteriales y venosos), los vasos linfáticos, las cavidades cardíacas y los cuerpos cavernosos.

El endotelio provee una superficie activa para el intercambio gaseoso, acuoso y macromolecular y para el tráfico celular.

Constituye una capa unicelular continua que sirve de interfase estructural y funcionalmente entre el torrente circulatorio y la pared vascular, que dispone de una amplia superficie de contacto, presentando importantes variaciones o especializaciones regionales. Por su localización capta señales químicas, físicas e inmunológicas y de acuerdo con éstas cumple funciones específicas.

Las células endoteliales tienen diversas funciones en la homeostasis, entre las que figuran las siguientes:

1. Forman una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y previenen la adherencia de las células sanguíneas.
2. Forman una barrera permeable para el intercambio de nutrientes entre el plasma y el intersticio celular, regulando al mismo tiempo el transporte de sustancias entre ambos.
3. Regulan la angiogénesis y el remodelado vascular.
4. Contribuyen a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular.
5. Producen factores de crecimiento en respuesta al daño vascular, influyendo especialmente en la proliferación del músculo liso vascular.
6. Producen sustancias que regulan la agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis. Sintetizan y degradan diversas hormonas.
7. Participan en la respuesta inmune generando citoquinas que modulan la actividad de los linfocitos.
8. Liberan agentes que actúan de forma paracrina sobre las células musculares lisas adyacentes, regulando su contracción.

Bajo condiciones fisiológicas mantiene el tono vascular normal y la fluidez de la sangre mediante la elaboración de una variedad de factores vasodilatadores, tales como el NO, el factor de hiperpolarización dependiente del endotelio, la prostaciclina, y también factores vasoconstrictores como la endotelina, prostanoides vasoconstrictores, angiotensina II y el anión superóxido (Ferroni *et al.*, 2006).

2.4.1 Disfunción endotelial.

La disfunción endotelial puede ser un predictor temprano de eventos cardiovasculares, particularmente en pacientes hipertensos (Zoccali *et al.*, 2006), lo cual se puede deber a una reducción en la biodisponibilidad de NO y a un incremento del estrés oxidativo (Taddei *et al.*, 2006).

El endotelio bajo condiciones patológicas puede modificar su fenotipo facilitando la vasoconstricción, inflamación y eventos trombóticos. Esta respuesta anormal se manifiesta en diferentes estados clínicos tales como hipercolesterolemia, diabetes mellitus (DM) e hipertensión, y ocurren en ausencia de cambios morfológicos en la pared. La etiología de estas alteraciones de la función endotelial es multifactorial, y los principales mecanismos aun no han sido totalmente dilucidados. Actualmente existen evidencias sustanciales que muchas funciones endoteliales son susceptibles a la presencia de EROS y el subsiguiente estrés oxidativo (Pràtico, 2005).

Se ha señalado que el estrés oxidativo puede ser responsable del aumento del tono vascular, aumento de la sensibilidad a vasoconstrictores, disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio y aumento del feedback tubuloglomerular en diversos estados fisiopatológicos (Schnackenberg, 2002a; 2002b).

La función endotelial es más claramente evaluada como la respuesta vasodilatadora a los estímulos (Laroia *et al.*, 2003). El delicado balance de la producción de estos moduladores vasoactivos resulta perturbado por los radicales libres, como también la respuesta a otras sustancias que ejercen su efecto a distancia sobre la actividad vasomotora (ej. angiotensina II).

A continuación se señalarán las principales características y funciones de estos moduladores vasoactivos:

2.4.1.1 Óxido nítrico.

Es un gas volátil simple, biológicamente activo, presente prácticamente en todos los tejidos y gracias a que tiene bajo peso molecular y propiedades lipofílicas, difunde muy fácilmente a través de la membrana celular (Esper *et al.*, 2006).

El NO se forma por la reacción catalizada por óxido nítrico sintasa (NOS). Se han identificado 3 isoformas de NOS: la endotelial o tipo III (eNOS), la neuronal o tipo I (nNOS) y la calcio independiente (iNOS).

La acción de NOS sobre el aminoácido L-arginina, produce NO y L-citrulina, requiriendo oxígeno y la coenzima NADPH (Esper *et al.*, 2006). También se requiere la presencia de calmodulina y de 3 cofactores que son: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD) y tetrahidrobiopterina, los que facilitan y aceleran el proceso.

La eNOS es calcio/calmodulina dependiente, se encuentra en el citosol, y solo produce cantidades importantes de NO al ser activadas por una elevación del calcio intracelular.

En presencia de la calmodulina los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por el FMN hacia el grupo hem. La L-arginina se convierte en N-hidroxialanina y luego en NO y L-citrulina.

Numerosos estudios han demostrado efectos beneficiosos en la suplementación aguda y crónica de L-arginina en la producción de NO y función endotelial, demostrando así su capacidad de reducir la presión sanguínea en algunas formas de hipertensión experimental (Gokce, 2004).

Por otra parte, un disturbio en el transporte de L-arginina ha sido descrito recientemente en hipertensos e individuos normotensos genéticamente predispuestos (Schlaich *et al.*, 2004).

El NO por ser un radical libre se une al oxígeno, dando dos productos principales que son: nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3).

El NO puede difundir hacia las células subyacentes donde activa la guanilciclasa (GC), lo que provoca el aumento intracelular de GMPc que es el mediador de sus efectos fisiológicos.

La liberación de NO se produce de manera pulsátil y el estímulo más importante para su liberación corresponde al *shear* estrés, que es causado por el incremento en la velocidad del flujo sanguíneo lo que lleva a una vasodilatación proporcional a la cantidad de NO liberado por el endotelio (vasodilatación endotelio – dependiente). Las membranas de la célula endotelial tienen canales iónicos especializados, como el canal de calcio activado por K^+ , que se abre en respuesta al *shear* estrés. Este efecto es para hiperpolarizar la célula endotelial, obligando al incremento del ingreso de calcio y activando la eNOS y la subsecuente generación de NO (Esper *et al.*, 2006).

El NO es muy inestable por su reacción con la oxihemoglobina y el superóxido, por lo que su vida media es muy corta (6 seg).

El NO, cumple importantes funciones para mantener la homeostasis vascular, ya que es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria (Laroia *et al.*, 2003). Inhibe también la adherencia y quimiotaxis de los monocitos y la proliferación de las células musculares lisas vasculares, procesos implicados en la aterogénesis (Cosentino y Lüscher, 2001).

La primera función del NO se lleva a cabo cuando al liberarse de las células endoteliales actúa a nivel de la fibra muscular cardíaca, sobre el receptor de GMPc produciendo un aumento de este, a su vez inhibiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular e impidiendo la liberación de Ca^{2+} intracelular, por lo que inhibe la contracción tanto de la fibra muscular cardíaca como la del endotelio favoreciendo así la vasodilatación.

Cuando disminuye la biodisponibilidad del NO aumenta el riesgo de disfunción endotelial y precisamente esto sucede en condiciones de estrés oxidativo en que aumenta la producción y/o disminuye la remoción de anión superóxido.

Además con la disminución del NO se aumenta la adhesión y agregación plaquetaria, la quimiotaxis de monocitos y su adhesión endotelial, y aumenta la proliferación de las células musculares lisas, lo que favorece la aparición de la HTA esencial además de hipertrofia vascular y enfermedad vascular oclusiva.

En presencia de estrés oxidativo, el anión superóxido actúa neutralizando al NO, con el cual se combina para formar peroxinitrito (Pryor y Squadrito, 1995), lo que explica el efecto vasoconstrictor del primero. El NO tiene una interacción recíproca con la endotelina-1 que permite explicar la disfunción endotelial de diversas enfermedades como la hipertensión (Alonso y Radomski, 2003).

2.4.1.2 Endotelina-1.

La endotelina es un péptido de 21 aminoácidos que tiene 3 isoformas (ET-1, ET-2 y ET-3)

A través de sus dos receptores ET-A ubicado en la célula muscular lisa (CML), y ET-B ubicados en la células musculares lisas y endoteliales. A partir del endotelio vascular se activa su producción, metabolización y excreción. Es considerado uno de los más potentes vasoconstrictores conocidos (Agapitov y Haynes, 2002).

Los receptores ET_A de las células musculares lisas, a través de la fosfolipasa C, permiten la formación de inositoltrifosfato y de diacilglicerol, segundos mensajeros que llevan a la liberación de calcio intracelular y a la activación de proteína kinasa C (Simonson

et al., 1989). Este efecto vasoconstrictor es reforzado por la acción de los receptores ET_B, que además poseen acciones proliferativas (Luscher *et al.*, 1993).

La producción de endotelina es estimulada por fuerzas mecánicas, hipoxia, trombina, arginina vasopresina, angiotensina II, interleucina y otros mediadores (Dohi *et al.*, 1992; Luscher *et al.*, 1992).

La ET-1 contribuye a la remodelación vascular en hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Amiri *et al.*, 2004).

Estudios acerca de la expresión génica de ET-1, realizados sobre células endoteliales de aorta de bovino, demostraron que concentraciones fisiológicas de F₂-isoprostanos estimulaban la producción de mRNA de endotelina y la expresión de la proteína (Yura *et al.*, 1999). Además, en las células musculares lisas tratadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) había un significativo aumento en la formación de ET-1 y F₂-isoprostanos (Ruef *et al.*, 2001), lo que indica que el estrés oxidativo aumenta la generación y la actividad autocrina de endotelina-1 en estas células. Además, la ET -1 influencia la homeostasis de la sal y el agua a través de una estimulación del sistema simpático, del eje renina-angiotensina-aldosterona, de la liberación de vasopresina y péptido natriurético auricular. Se ha comprobado que el bloqueo de los receptores de ET -1 mejora la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio en pacientes con hipertensión esencial (Cardillo *et al.*, 2002), mediante una mayor producción basal y respuesta de NO (Klingbeil *et al.*, 2003). Recientemente se ha sugerido que el efecto vasodilatador producido por el *shear estrés* obedece a que las células endoteliales censan el *shear estrés* como estrés oxidativo y traducen una señal que disminuye la expresión de la enzima convertidora de endotelina y su respectivo mRNA (Masatsugu *et al.*, 2003).

2.4.2. Otros marcadores de disfunción endotelial.

La disfunción endotelial es también caracterizada por un cambio fenotípico y un incremento en la adhesividad de las células vasculares. Respecto a esto, actualmente se han realizado diversos estudios que demuestran la liberación de moléculas de adhesión activadas a partir del endotelio durante la hipertensión. Algunos ejemplos son el factor de von Willebrand (vWF), las moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), las moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y las E-selectinas (Nadar *et al.*, 2004).

Entre estos, el vWF es probablemente el más extensamente estudiado de estos productos endoteliales. Así se demostró la presencia de un incremento en los niveles de vWF

en pacientes con hipertensión esencial y microalbuminuria, sugiriendo que la disfuncionalidad del endotelio glomerular puede causar una disminución de la función renal (Pedrinelli *et al.*, 1994).

Mientras el vWF es un marcador establecido de daño y disfunción endotelial, otros marcadores pueden reflejar distintas funciones del endotelio. ICAM-1, por ejemplo, refleja una disrupción del equilibrio entre mecanismos pro y anti-inflamatorios, y se ha propuesto que ICAM-1 y FMD se han relacionado para estimar riesgo de enfermedades coronarias, independientemente de otros factores asociados (Witte *et al.*, 2003). Así pruebas bioquímicas y hemodinámicas de la función endotelial pueden dar información complementaria en la predicción de riesgo de pacientes hipertensos.

Niveles plasmáticos de moléculas de adhesión solubles (E-selectinas, ICAM-1, VCAM-1) también mostraron ser elevados en pacientes hipertensos en comparación a controles normotensos (Blann *et al.*, 1994; Parissis *et al.*, 2001), e incluso elevaciones suaves de presión sanguínea podrían ser suficientes para activar su expresión (Preston *et al.*, 2002).

2.5 Radicales libres.

Los radicales libres son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados. Debido a esto, pueden ser moléculas muy reactivas, que al no poseer receptores específicos, atacan o inestabilizan todo lo que encuentran al frente, mediante acciones directas o indirectas, reversibles o irreversibles sobre distintas biomoléculas (Gutteridge y Halliwell, 2000).

Los radicales libres pueden ser generados por disfunción del sistema de transporte mitocondrial de electrones, la reacción de xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, la activación de neutrófilos, el metabolismo del ácido araquidónico y la autooxidación de catecolaminas.

La importancia biológica de estas especies químicas estriba en que pueden alterar la estructura de las membranas celulares, producir daño en las proteínas intracelulares, oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y aceleración del envejecimiento celular. En los elementos químicos y en las moléculas en que ellos entran en combinación los electrones se encuentran habitualmente apareados. Así, en un enlace covalente se puede encontrar un par de electrones con el aporte de cada uno de los elementos que forman ese enlace. Un radical libre es una especie química que contiene un electrón desapareado, lo que generalmente se traduce en un aumento de la reactividad de la sustancia, en relación a la especie no radicalaria que la genera (Rodrigo y Rivera, 2003).

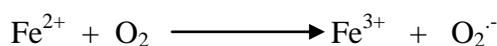
Los radicales libres pueden formarse químicamente por la transferencia de un electrón, o bien por la ruptura homolítica de un enlace covalente de una molécula normal, lo que significa que cada fragmento de la molécula retiene uno de los electrones que formaban el par del enlace (Rodrigo y Rivera, 2003).

Durante el metabolismo aeróbico las células generan energía reduciendo al oxígeno molecular hasta la formación de agua. Esta reacción, que ocurre en la mitocondria catalizada por la citocromo c oxidasa, involucra la transferencia de cuatro electrones al oxígeno sin formación de intermediarios. Pero una pequeña proporción del oxígeno (2-4%) puede aceptar un número menor de electrones, dando lugar a la formación de intermediarios conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO). De esta manera, el oxígeno se puede reducir sucesivamente a anión superóxido (O_2^-) al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al aceptar 2 electrones y a radical hidroxilo ($\bullet OH$) al aceptar 3 electrones. Otra ERO es el oxígeno singlete o singulete (1O_2), que puede generarse, por ejemplo, cuando los electrones han sido excitados por la luz. Cuando las ERO se encuentran en exceso, reaccionarán con diversas biomoléculas causando citotoxicidad y daño mutagénico (Rodrigo y Rivera, 2003).

La ERO más común es el anión superóxido, generado en células vivas por: xantina oxidasa, NADPH oxidasa, citocromo P450 microsomal y las enzimas mitocondriales de la cadena transportadora de electrones, entre otras.

Bajo condiciones fisiológicas cada día el 3% de la hemoglobina total se convierte a la forma oxidada (metahemoglobina). La autoxidación de la hemoglobina resulta en la generación de O_2^- . Además, el O_2^- también es producido a través de reacciones de algunas moléculas con el oxígeno (adrenalina, dopamina, tetrahidrofolato, citocromos, entre otros y por células en que ocurre el mecanismo de la fagocitosis (polimorfonucleares neutrófilos, monocitos, macrófagos). El anión superóxido en sí no es una especie química particularmente nociva para las células, excepto cuando se encuentra protonado (radical perhidroxilo: $HO_2\bullet$), lo que sólo ocurre en la proporción del 1% al pH fisiológico. Sin embargo, el O_2^- puede ejercer acciones deletéreas derivadas de los productos que genera o consume en las reacciones químicas en que interviene (Rodrigo y Rivera, 2003).

Los iones metálicos de los elementos de transición, especialmente cuando se encuentran en el estado reducido, pueden sufrir una autoxidación a la vez que transforman la molécula de oxígeno en anión superóxido:



El peróxido de hidrógeno aunque no es un radical libre (pero se considera también una de las especies reactivas de oxígeno) puede generar un radical libre extremadamente reactivo, como es al hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) en presencia de iones metálicos como Fe^{2+} , Cu^+ ó Mn^+ a través de la reacción de Fenton (Rodrigo y Rivera, 2003).

Por otra parte, estos iones al estado reducido también pueden catalizar la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, conocida como la reacción de Haber-Weiss (Rodrigo y Rivera, 2003).

Es importante señalar que los iones metálicos de elementos de transición pueden catalizar estas reacciones químicas solamente cuando se encuentran libres. Por lo tanto, una manera de controlar este efecto es a través de la formación de complejos con sustancias quelantes, que por esta vía previenen la formación de radicales libres.

Como ya fue señalado, el radical $\bullet\text{OH}$ es extremadamente reactivo y puede reaccionar con cualquier molécula orgánica abstrayéndole un átomo de hidrógeno a la vez que se forma otro radical libre (Rodrigo y Rivera, 2003).

El endotelio es un tejido altamente sensible al daño producido por los radicales libres, afectando con esto, entre otros, a lípidos, proteínas y ADN. El daño puede ser inducido tanto por las ERO o de nitrógeno, como el peroxinitrito.

La hipertensión se encuentra asociada con una elevación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y frecuentemente también con un deterioro de los mecanismos antioxidantes endógenos (Lassègue y Griendling, 2004).

Se han desarrollado diversos modelos de hipertensión experimental en ratas espontáneamente hipertensas. En estos modelos se han encontrado incrementados en la pared vascular, corazón y riñón, ROS tales como anión superóxido y peróxido de hidrogeno, y marcadores de oxidación tales como F2-isoprostanos, malondialdehído y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (Lassègue y Griendling, 2004).

2.6 Defensas antioxidantes.

Existen mecanismos de defensa contra la acción nociva de los radicales libres, los cuales están constituidos por enzimas y moléculas antioxidantes. La acción de estos

mecanismos de defensa antioxidante se traduce en una mayor depuración de radicales libres o en su transformación en especies de menor reactividad (Rodrigo y Rivera, 2003).

Un antioxidante se puede definir como "Aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones comparada a un sustrato oxidable e inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato" (Halliwell y Gutteridge, 1995). A partir de esta definición se considera que las defensas antioxidantes incluyen:

- a) Los agentes que remueven catalíticamente las especies reactivas.
- b) Las proteínas que minimizan la disponibilidad de prooxidantes como iones de fierro o cobre.
- c) Las proteínas que protegen biomoléculas por otros mecanismos.
- d) Agentes de bajo peso molecular que reducen las especies reactivas (Rodrigo y Rivera, 2003).

Posteriormente, este concepto fue aplicado a los antioxidantes aportados por la dieta, los que quedaron definidos como "sustancias presentes en los alimentos que disminuyen los efectos de las especies reactivas, tales como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno".

Las defensas antioxidantes del organismo se pueden clasificar en 2 categorías: enzimas y moléculas. Las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), constituyen la primera línea de defensa contra los radicales libres y esta acción se lleva a cabo neutralizando a estas especies químicas a través de la conversión en otras de efecto menos dañino (Rodrigo y Rivera, 2003).

2.6.1 Superóxido dismutasa (SOD).

Esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido (dismutación es una reacción de destrucción de radicales libres en que a partir de éstos se forman especies no radicalarias). Así, reaccionan dos moléculas de anión superóxido para formar peróxido de hidrógeno, el cual a su vez puede ser destruido por las actividades de catalasa o glutatión peroxidasa (Rodrigo y Rivera, 2003).



En el ser humano existen 3 clases de SOD: Mn-SOD mitocondrial, Cu/Zn-SOD citosólica y SOD extracelular. La Mn-SOD es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de Mn en cada subunidad y es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el

desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las ERO; además, es inducida por su sustrato u otros oxidantes y su expresión es aumentada por el factor de necrosis tumoral-alfa (Gutteridge y Halliwell, 2000).

Se ha Postulado que Cu/Zn SOD es la enzima clave en la protección de la pared vascular frente al daño oxidativo (Sato *et al.*, 2002).

Se ha comprobado que, en ratas espontáneamente hipertensas, una deficiencia dietética de Zn durante 4 semanas altera los niveles de presión sanguínea sistémica por un deterioro en la actividad de la Cu/Zn SOD (Sato *et al.*, 2002).

Estudios experimentales han revelado que la administración crónica de tempol, un compuesto de efecto mimético de superóxido dismutasa, a ratas espontáneamente hipertensas, reduce en forma concomitante la presión arterial y el estrés oxidativo *in vivo*, lo que se deduce de la caída en la excreción urinaria de F₂-isoprostanos (Schnackenberg *et al.*, 1999).

Un estudio muestra que la hipertensión en pacientes de edad avanzada está asociada a un desbalance en el estatus antioxidante, reflejado en una disminución de la concentración de GSH y actividad de Cu/Zn SOD (Kedziora-Kornatowska *et al.*, 2004)

2.6.2 Catalasa (CAT).

Es una enzima tetramérica de 60 kDa formada por cuatro subunidades idénticas. Es una de las enzimas más eficientes de las conocidas, tanto que no puede ser saturada por H₂O₂ a ninguna concentración, catalizando su conversión en H₂O y O₂



En animales, el H₂O₂ se detoxifica mediante las actividades de la CAT y GSH-Px. Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Cheeseman y Slater, 1993).

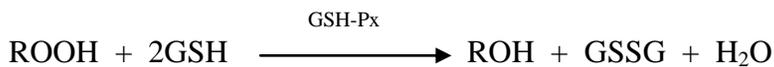
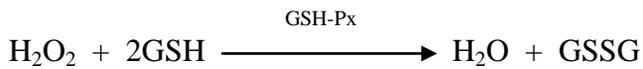
Cuando los niveles de ROS y H₂O₂ están incrementados, el organismo produce mas CAT para remover el H₂O₂ y así asegurar la detoxificación de ROS (Kashyap *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que la actividad de ácido ascórbico se encuentra correlacionada con la de CAT y de grupos azufrados no proteicos en la remoción de ROS. A medida que aumenta la actividad de ácido ascórbico, se incrementa la actividad de CAT y de grupos

azufrados no proteicos. Cuando existe sobreproducción de ROS, disminuye la actividad de ácido ascórbico y por consiguiente, de CAT (Kashyap *et al.*, 2005).

2.6.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px).

Es una enzima formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GSH-Px comparte su sustrato con la CAT, pero además puede reaccionar en forma efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutatión reducido (GSH), y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (Cheeseman y Slater, 1993).



Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GSH-Px en mamíferos, cuyos niveles varían dependiendo del tejido. La GSH-Px citosólica o mitocondrial reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H₂O₂ a expensas del glutatión. El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección en situaciones de bajos niveles de estrés oxidativo, pero la CAT es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo. En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H₂O₂ es la GSH-Px, ya que la CAT presenta mucha menos afinidad por el H₂O₂. La GSH-Px es una enzima dependiente del aporte dietético de selenio (Se), elemento traza que puede por lo tanto modular la actividad de esta enzima (Rodrigo y Rivera, 2003).

Un estudio demostró baja actividad de Se GSH-Px en sangre entera de pacientes hipertensos y con falla cardiaca crónica (Mihailovic *et al.*, 1998).

GSH-Px estaría inhibiendo la formación de lipoperóxidos por la conversión en alcoholes (OH-) con lo que disminuye la lipoperoxidación y daño celular. También previene la oxidación por remoción de H₂O₂, mediante la formación de H₂O y O₂ (Kashyap *et al.*, 2005). Por lo tanto una disminución en los niveles de actividad de GSH-Px resultan en una

acumulación de lipoperóxidos y H_2O_2 lo que lleva al aumento de estrés en la pared arterial, pudiendo causar además hipertensión e injuria celular (Kashyap *et al.*, 2005).

2.6.4 Sustancias o moléculas antioxidantes.

La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimático, dada por compuestos antioxidantes que actúan a nivel celular y extracelular, que son responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos (plasma) y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Las moléculas antioxidantes son vitaminas, minerales y otras sustancias de bajo peso molecular que inhiben la tasa de oxidación de los radicales libres. Pueden aumentar su velocidad de ruptura, prevenir la participación de iones de metales de transición, inactivar y barrer (*scavengers*) para proteger el organismo de infecciones, deterioro celular, envejecimiento prematuro y cáncer (Cheeseman y Slater, 1993).

Las enzimas antioxidantes requieren metales como cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) o selenio (Se) para su acción, éstos se conocen como metales antioxidantes. A diferencia de las enzimas antioxidantes, que no se consumen, las sustancias antioxidantes se modifican al reaccionar con los radicales libres y deben reemplazarse porque sí se consumen. Algunos de origen endógeno, tales como glutatión, urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas, deben ser reemplazados por síntesis.

Si son de origen exógeno, (provenientes de la dieta) para ser reemplazados necesitan ser nuevamente ingeridos. Una molécula antioxidante al reaccionar con un radical libre se puede transformar en otro radical libre más estable y por lo tanto menos dañino para el organismo. Otra de las acciones de los antioxidantes consiste en formar complejos con los iones metálicos (acción quelante) impidiendo de esta manera que estos iones lleguen a favorecer la formación de radicales libres. Son fundamentales para la prevención de enfermedades porque son fácilmente modificables.

Entre los compuestos más representativos de antioxidantes endógenos intracelulares se puede mencionar al glutatión reducido (GSH), la tioredoxina, la glutaredoxina, aminoácidos, melatonina y otros. Entre los antioxidantes exógenos se encuentran la vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno (provitamina A), vitamina A, bilirrubina, ácido úrico, polifenoles, entre otros.

El tripéptido glutatión (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en las mayores concentraciones intracelulares. Actúa como cofactor de la GSH-Px

para detoxificar H_2O_2 ; puede detoxificar radicales libres por vías no enzimáticas, por ejemplo, participa en la detoxificación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular. La medición del glutatión oxidado (GSSG) es uno de los mejores medidores de la generación de oxiradicales de forma droga-dependiente. El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de comunicación intercelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de enzimas en diversas vías. También el GSH participa en la regulación del estado redox de los disulfuros en proteínas con otras moléculas como la tioredoxina y glutaredoxina, entre otros tioles.

Se ha demostrado una disminución significativa en el nivel de selenio presente en plasma y sangre de pacientes hipertensos y con falla cardiaca crónica, respecto a controles (Mihailovic *et al.*, 1998).

El ácido ascórbico remueve directamente ROS e iones de metales de transición, pero frente a una sobreproducción de ROS se puede inhibir la actividad de ácido ascórbico (Kashyap *et al.*, 2005).

Mediante el ensayo FRAP, que mide la reducción de ion Fe^{3+} a Fe^{2+} se puede dar cuenta del nivel antioxidante del plasma, mediante una reacción colorimétrica. Durante el desarrollo de hipertensión arterial se produce una significativa disminución en los niveles de FRAP, lo que es indicativo de la presencia lipoperoxidación y daño celular (Kashyap *et al.*, 2005)

2.7 Estrés oxidativo en hipertensión.

El sistema de defensa antioxidante puede manejar y disponer de las ERO formadas evitando que estas especies aumenten lo suficiente como para producir daño a biomoléculas y estructuras de la célula. Esto obedece a que el organismo dispone de mecanismos antioxidantes defensivos para combatir la producción normal de radicales libres. Sin embargo, hay situaciones patológicas en las cuales se elevan las ERO en el estado estacionario como resultado de un desbalance producido entre los efectos prooxidantes y las defensas antioxidantes con predominio de los primeros. Este estado metabólico es lo que se conoce como **estrés oxidativo** y ha sido definido como “un trastorno en el balance prooxidante-antioxidante a favor del prooxidante, que conduce a daño potencial” (Sies, 1991). Esta situación se puede dar en determinadas circunstancias en que aumenta la generación de radicales libres (radiaciones, isquemia y reperfusión, activación de los leucocitos, efecto de tóxicos, drogas, etc).

El estrés oxidativo ha sido implicado como la causa en la fisiopatología de muchas condiciones cardiovasculares incluyendo la hipertensión (Cai y Harrison, 2000).

Hallazgos experimentales sugieren que los radicales libres pueden contribuir en la génesis de la hipertensión arterial esencial. Se ha documentado que en el contexto de estrés oxidativo se produce un aumento del tono vascular renal, aumento de la sensibilidad a los vasoconstrictores, alteraciones en la vasodilatación endotelio dependiente, eventos que se relacionan con la aparición de hipertensión (Rodrigo y Rivera, 2003).

A continuación se señalan evidencias experimentales que implican al estrés oxidativo en la patogenia de la HTA.

2.7.1 F₂-isoprostanos.

Son compuestos químicamente semejantes a prostaglandinas que se forman de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico, catalizada por radicales libres, y que tienen marcados efectos biológicos (Crakowski *et al.*, 2001) a través de los cuales pueden alterar la regulación de la presión arterial (Yamada *et al.*, 1999).

Durante una infusión sistémica de F₂-isoprostanos aún cuando no se observan alteraciones significativas de la presión arterial, se ha demostrado que se produce vasoconstricción renal con reducción de un 40 a 45% del flujo plasmático renal y la velocidad de filtración glomerular (Morrow *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1992). Este efecto selectivo en la vasculatura renal se ejerce primariamente en la arteriola aferente, lo que determina una caída de la presión hidrostática en los capilares glomerulares (Fukunaga *et al.*, 1993). Además, los F₂-isoprostanos pueden inducir mitogénesis en las células musculares lisas de la pared vascular y liberación de ET-1, potente vasoconstrictor, en células endoteliales de aorta de bovino (Fukunaga *et al.*, 1993; Fukunaga *et al.*, 1995).

Por lo tanto existen evidencias suficientes que han detectado un aumento de F₂-isoprostanos, que indicarían que la lipoperoxidación coexistiría con las alteraciones vasculares que derivarían en un alza de la presión arterial.

2.7.2 Anión superóxido.

La enzima encargada de su depuración es la superóxido dismutasa (SOD). Cuando aumenta la producción y/o disminuye la depuración de anión superóxido, éste puede inactivar la acción vasodilatadora del NO. La actividad de la NADPH oxidasa, principal enzima encargada de su producción, puede ser modulada por ET-1 a través del efecto producido en

los receptores ET_A, cuya activación se traduce en una mayor producción de superóxido en la pared vascular (Li *et al.*, 2003). Un ejemplo en el cual interviene este mecanismo es el de la hipertensión en la insuficiencia renal crónica, que se asocia con una disminución de la actividad enzimática de la SOD y una mayor expresión de la actividad de la NADPH oxidasa (Vaziri *et al.*, 2003a).

También, la hipertensión inducida por plomo, que se sabe cursa con estrés oxidativo, se asocia a sobreexpresión de NADPH oxidasa sin cambios de las 3 enzimas antioxidantes (Vaziri *et al.*, 2003b).

Estudios realizados en ratas espontáneamente hipertensas sugieren que el aumento en la producción de superóxido contribuye al desarrollo de hipertensión a través de la activación del sistema nervioso simpático (Shokoji *et al.*, 2003). A su vez, el tratamiento crónico de estas ratas con antioxidantes como N-acetilcisteína o melatonina, que reduce los niveles de superóxido, resulta en una disminución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, sugiriéndose una inhibición de la actividad simpática (Girouard *et al.*, 2003).

El anión superóxido es el mayor determinante en la biosíntesis y biodisponibilidad de NO, y puede así modificar la función endotelial. Puede también actuar como un vasoconstrictor.

La isoforma eNOS, es reconocida como un importante origen de superóxido. Se descubrió que eNOS puede generar más superóxido que NO en respuesta a una estimulación aterogénica. Esto ha llevado al concepto de “desacoplamiento de eNOS”, donde la actividad de la enzima para la producción de NO es baja, en asociación con un incremento en la producción de superóxido-NOS dependiente. En la medida que eNOS pueda convertirse en generador de peroxinitrito esto lleva hacia un dramático incremento en estrés oxidativo, desde el peroxinitrito formado por la reacción de NO-superóxido, generando un efecto detrimental en la función vascular por oxidación de proteínas celulares y lípidos (White *et al.*, 1994).

2.7.3 Peroxinitrito.

Este compuesto es un potente vasodilatador *in vivo*, y produce reducciones de la presión arterial media y de la resistencia vascular en la rata. Sin embargo, esta vasodilatación está sujeta a rápida taquifilaxis (Kooy & Lewis, 1996), lo que altera la subsiguiente respuesta vascular a otros vasodilatadores. Así, después del desarrollo de taquifilaxis por peroxinitrito,

se atenúan significativamente los efectos hemodinámicos de la administración de acetilcolina y prostaciclina.

Además, el peroxinitrito no sólo elimina el efecto vasodilatador de la PGI₂, sino que también permite y promueve la acción de PGH₂, potente vasoconstrictor (Zou *et al.*, 1999). La administración crónica de N-acetilcisteína tiene un efecto protector contra el daño de la relajación dependiente del endotelio producido por peroxinitrito en las ratas espontáneamente hipertensas (Cabassi *et al.*, 2001). A partir de estos hallazgos se puede sugerir que la mayor producción *in vivo* de peroxinitrito puede tener una contribución en la patogenia de la hipertensión esencial.

2.7.4 Angiotensina II.

Se ha demostrado que la angiotensina II puede estimular el estrés oxidativo, el que a su vez podría activar varios mecanismos vasopresores que pueden potenciar el efecto vasoconstrictor de la angiotensina (Reckelhoff y Romero, 2003).

Merece especial mención el hecho que la angiotensina pueda estimular la formación de anión superóxido, que puede consumir NO al reaccionar con éste para formar peroxinitrito (Pryor y Squadrito, 1995). A su vez, el peroxinitrito podría oxidar al ácido araquidónico, liberando F₂-isoprostanos, compuestos de propiedades vasoconstrictoras y natriuréticas intrínsecas, planteándose la posibilidad que ellos contribuyan al efecto hipertensivo a largo plazo de la angiotensina II (Haas *et al.*, 1999). Además, se comunicó que la disfunción endotelial aparentemente precede a otras patologías vasculares inducidas por angiotensina II, pudiendo estos efectos ser mediados por la formación *in vivo* de peroxinitrito (Wattanapitayakul *et al.*, 2000). También, el aumento de la presión arterial por dosis subpresoras de angiotensina II puede ser prevenido bloqueando los receptores de endotelina-1, lo que sugiere que el aumento de F₂-isoprostanos, debido al estrés oxidativo, podría participar en la respuesta hipertensiva a angiotensina II (Ortiz *et al.*, 2001).

2.7.5 Homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido sulfurado que se forma durante el metabolismo del aminoácido esencial metionina (Rodrigo *et al.*, 2003). Normalmente la metilación de metionina para formar homocisteína es regulada por 2 vías. En una el folato dona los grupos thiol por una vía vitamina B₁₂ dependiente, catalizado por la enzima metiltetrahidrofolato

reductasa. La otra por una trans-sulfuración que requiere vitamina B₆ como cofactor (Jacobs *et al.*, 2006)

La homocisteína es filtrada y metabolizada por el riñón. La tasa de filtración glomerular es el mejor predictor independiente de la concentración de homocisteína plasmática (Kashyap *et al.*, 2005). Es importante hacer notar que solo la homocisteína libre es filtrada y metabolizada por el riñón.

La elevación de los niveles de homocisteinemia puede obedecer tanto a factores genéticos, cuya causa más común es la deficiencia de cistationina- β -sintasa, como a factores ambientales entre los que se encuentran las deficiencias de los cofactores requeridos para el metabolismo de la homocisteína [cianocobalamina (vitamina B12), piridoxina (vitamina B6) y ácido fólico]. Así, la homocisteinemia de los vegetarianos es más elevada que la de los omnívoros, como consecuencia de la deficiencia de B12 de los primeros (Rodrigo *et al.*, 2003).

Estudios experimentales han demostrado que altas concentraciones de homocisteína pueden causar daño vascular y estudios epidemiológicos publicados en los últimos 10 años han mostrado que altas concentraciones plasmáticas de homocisteína total se asocian con síntomas de enfermedad cardiovascular (Kashyap *et al.*, 2005).

Sin embargo, estudios recientes han señalado que la hiperhomocisteinemia leve no es capaz de inducir disfunción endotelial en hombres jóvenes (Hirsch *et al.*, 2002).

Se ha demostrado asociación entre niveles de homocisteína plasmática y presión arterial especialmente la sistólica (Van Guldener *et al.*, 2003).

Se encontró un deterioro en las propiedades vasodilatadoras de la célula endotelial normal por hiperhomocisteinemia debido a una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Aunque este efecto ocurre sin afectar la expresión de la óxido nítrico sintasa, la habilidad de la célula por generar NO, es suprimida a través de la formación de peroxinitrito en la reacción ocurrida entre el anión superóxido y NO (Rodrigo *et al.*, 2003)

El mecanismo fisiopatológico mediante el cual la hiperhomocisteinemia induce hipertensión también abarca la estimulación en la proliferación de las células musculares lisas, bajo estatus de folato, y la alteración en las propiedades elásticas de la pared vascular a través de una disminución de la relación elastina/colágeno induciendo rigidez arterial (Rodrigo *et al.*, 2003; Van Guldener *et al.*, 2003).

La homocisteína también incrementa el espesor de la capa íntima media vascular, produce descamación de las células endoteliales, e incrementa la adhesión de monocitos a la pared vascular (Rodrigo *et al.*, 2003)

2.8 Daño Sobre Biomoléculas.

Las reacciones de las ERO con sustratos orgánicos son complejas y pueden afectar diversas estructuras de la célula según el tipo de biomolécula (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) que resulte atacado por ellas, pudiendo llegar a inducir apoptosis e incluso producir la muerte celular.

2.8.1 Lipoperoxidación.

De todas las biomoléculas que pueden ser atacadas por las ERO los lípidos, especialmente los fosfolípidos de membranas, son probablemente las más susceptibles. Esto parece estar relacionado con el grado de insaturación de estas moléculas. Las reacciones de lipoperoxidación consisten en un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Como consecuencia de este proceso, se destruyen los PUFA, compuestos que poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble enlace, que les confiere una zona de enlace lábil (hidrógeno alílico) que permite que una molécula activa como el radical hidroxilo les sustraiga un átomo de hidrógeno (etapa de iniciación). Así, se genera un radical lipídico que continúa participando de reacciones en cadena (etapa de propagación), ya que se trata de un proceso autocatalítico, perpetuando así el proceso. El radical lipídico se combina con el oxígeno formando un lipoperóxido, el que a su vez puede retirar un nuevo átomo de hidrógeno de otro carbono molecular y formar un hidroperóxido. La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a su término cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, al romperse generan aldehídos de bajo peso molecular (como por ejemplo el MDA que puede ser medido espectrofotométricamente) y cadenas hidrocarbonadas (etano, etileno, pentano, dienos conjugados, entre otros). Los aldehídos son moléculas muy reactivas y, por lo tanto, se desplazan sólo hasta escasa distancia del sitio de su formación.

La lipoperoxidación afecta principalmente a los fosfolípidos de las membranas celulares, donde residen los ácidos grasos poliinsaturados. En el caso del ácido araquidónico, su lipoperoxidación forma compuestos entre los que se encuentran los F_2 -isoprostanos (8-isoprostanos u 8-iso-PGF₂α) que poseen una estabilidad que permite utilizarlos como

biomarcadores de estrés oxidativo *in vivo*, ya que sus niveles pueden ser medidos en el plasma. De esta manera, se puede evaluar la contribución del estrés oxidativo en una determinada situación fisiológica o fisiopatológica; o bien, probar la eficacia que un tratamiento o intervención pueden tener en disminuir los niveles de estrés oxidativo.

En modelos experimentales, sobre ratas espontáneamente hipertensas, se ha encontrado aumento de marcadores de oxidación tales como F2-isoprostanos, malondialdehído y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en la pared vascular, corazón y riñón (Lassègue y Girendling, 2004). En un grupo de pacientes hipertensos, la concentración de MDA medida en el eritrocito fue significativamente mayor, respecto a pacientes normotensos (Kedziora-Kornatowska *et al.*, 2006).

3. HIPÓTESIS.

Los pacientes portadores de HTA esencial, al ser comparados con normotensos sanos, exhiben alteraciones bioquímicas que señalan la ocurrencia de estrés oxidativo, cuyos parámetros muestran una correlación con los niveles de presión arterial.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Evaluar la relación entre la presentación de hipertensión arterial esencial con el estrés oxidativo.

4.2 Objetivos Específicos.

- Medir y comparar la capacidad antioxidante del glóbulo rojo y del plasma sanguíneo de pacientes hipertensos con individuos normotensos sanos.
- Medir y comparar los parámetros de estrés oxidativo de pacientes hipertensos con individuos normotensos sanos.
- Correlacionar los valores obtenidos de capacidad antioxidante y de parámetros de estrés oxidativo con los valores de presión arterial del grupo con HTA esencial.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Diseño del protocolo de estudio de los pacientes:

5.1.1 Selección de pacientes hipertensos: Se realizó un estudio caso-control de carácter prospectivo, consistente en seleccionar pacientes hipertensos esenciales, sexo masculino, entre 30 y 65 años de edad, a los cuales se les aplicó una evaluación clínica estandarizada basada en el más reciente informe del *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (Chobanian *et al.*, 2003), orientada a:

- 1) Determinar el estilo de vida del paciente e identificar factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV).
- 2) Revelar causas identificables de hipertensión arterial.
- 3) Determinar la presencia o ausencia de daño de órgano blanco y ECV.

Luego de esta evaluación clínica se seleccionaron los pacientes que fueron ingresados al protocolo los cuales debieron cumplir con la categoría de:

Hipertensión esencial, sin factores de riesgos de ECV tales como, tabaquismo, alcoholismo, obesidad, dislipidemia, entre otros, ya que pueden provocar estrés oxidativo, y que además firmen el consentimiento informado. Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

5.1.2 Selección de controles sanos: Por cada paciente hipertenso seleccionado se incorporó al protocolo de estudio un control sano, normotenso, del mismo rango de edad. El grupo control sirvió para estandarizar los valores normales de los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo.

5.1.3 Condiciones de los pacientes para la obtención de la muestra: previo al momento de obtención de la muestra de sangre, los pacientes son citados en ayuno de 12 horas.

5.2 Procesamiento de la muestra.

La muestra de sangre fue procesada de la siguiente manera:

- Se recibió en tubos con EDTA 5% como anticoagulante.
- A continuación se centrifugó a 2862 x g durante 15 min, para separar el plasma del sedimento (eritrocitos).
- El sedimento obtenido fue lavado con suero fisiológico y centrifugado a 2862 x g durante 10 min, procedimiento que se repitió 2 veces.
- El sedimento fue hemolizado con 3 volúmenes de agua destilada.

- Tanto el plasma como el hemolizado de eritrocitos fueron almacenados a -70°C .
- En el plasma se determinó la capacidad antioxidante total y los niveles de F_2 -isoprostanos, mientras que en el hemolizado de eritrocitos se determinó la relación GSH/GSSG, la concentración de malondialdehído (MDA) y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GSH-Px.

5.3 Evaluación de los parámetros relacionados con estrés oxidativo.

5.3.1 Capacidad antioxidante total del plasma (FRAP).

Se utilizó el método FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) que mide la capacidad del plasma para reducir el hierro férrico a ferroso siguiendo la cinética a 593 nm (Benzie y Strain, 1996). La técnica consiste en lo siguiente:

- **Reactivos utilizados**
 - solución FRAP: contiene 15 mL de Tampón acetato pH 3,6 + 1,5 mL de solución TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) y 1,5 mL de cloruro ferrico. Se preincuba en baño termostático a 37°C durante 2 min.
- **Procedimiento:**
 - Se preparan los tubos blancos que contienen 750 μL de solución FRAP y 100 μL de agua bidestilada. Se incuba en baño termostático a 37°C durante 2 min.
 - Los tubos de muestra contienen 750 μL de solución FRAP más 75 μL de agua bidestilada. Se incuba en baño termostático a 37°C durante 2 min.
 - El tubo blanco se agita en Vortex, la mezcla se transfiere a cubeta de 1 mL y se realiza un barrido (*scan blank*) hasta estabilizar la absorbancia del blanco en un valor cercano a cero a 593 nm. La lectura del blanco corresponde al valor cero de la curva de calibración.
 - Al tubo muestra se le agregan 25 μL de plasma o estandar, se agita en Vortex y se transfiere a cubeta de 1 mL. Se espera 60 seg y se registran las lecturas a 593 nm. Estas lecturas corresponden a muestras o estandares.
 - Los valores obtenidos se expresan en μM (micromolar).

5.3.2 Actividad de enzimas antioxidantes en hemolizado de eritrocitos:

5.3.2.1 Catalasa (CAT).

Se determinó por método espectrofotométrico siguiendo la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm (Aebi, 1974) y se calculó la constante cinética para la reacción de primer orden (k). La técnica consiste en:

- **Reactivos utilizados**

- Triton etanol 10%: 300 μ L de etanol absoluto + 300 μ L de triton X-100 (sigma X100) y 2400 μ L de Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.
- Peróxido de hidrógeno 30 mM: 85 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% diluido en 25 mL de Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.
- Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.

- **Procedimiento**

- Se mezclan 450 μ L de hemolizado de eritrocitos con 50 μ L de Triton etanol. Se agita en vortex, y se deja reposar en hielo durante 30 min.
- Transcurrido este tiempo, se realiza la dilución mezclando 25 μ L de esta muestra en 5 mL de Tampón fosfato 50 mM pH 7,0.

- **Ensayo no enzimático:**

En una cubeta de cuarzo agregar 3 mL de Tampón fosfato. Hacer un *scan blank* en el espectrofotómetro.

Mezclar 2 mL de Tampón fosfato + 1 mL de peróxido de hidrógeno 30 mM. Agitar en Vortex y transferir a la cubeta de cuarzo. Registrar las lecturas a 240 nm en intervalos de 5 ó 10 seg, durante 1 min.

- **Ensayo enzimático:**

Mezclar 2 mL de muestra (dilución) + 1 mL de Tampón, transferir a cubeta de cuarzo y hacer un *scan blank* en el espectrofotómetro.

Mezclar 2 mL de muestra (dilución) + 1 mL de H₂O₂ 30 mM. Agitar en Vortex y transferir inmediatamente a la cubeta de cuarzo para registrar las lecturas en la misma forma antes descrita.

Finalmente los valores obtenidos de la actividad enzimática de CAT (pendiente de la curva semilogarítmica) se expresan en: k/gr Hb.

5.3.2.2 Superóxido dismutasa (SOD).

Se midió la cinética de inhibición de la auto-oxidación de adrenalina a 480 nm por espectrofotometría (Misra y Fridovich, 1972). La técnica consiste en lo siguiente:

- Preparar solución de adrenalina 60 mM. , pesando 55 mg de epinefrina, los que serán diluidos en 5 mL de agua destilada, ajustando el pH a 2,0 con aproximadamente 7 μ L de ácido clorhídrico concentrado.

- **Centrifugación para obtención de la muestra:**

1. transferir 6 mL de hemolizado de eritrocitos en tubos de 10 mL de policarbonato, con tapa atornillada para la centrifugación.
2. Contrapesar pares de tubos.
3. Centrifugar en la ultracentrífuga a 100.000 x g durante 45 min.
4. Obtener el sobrenadante (enzimas) y almacenar en tubos eppendorf (1 mL) en freezer. Las muestras obtenidas mediante este procedimiento servirán para las determinaciones de las enzimas SOD y GSH-Px.

- **Dilución de la muestra:**

100 μ L muestra + 900 μ L de KCl-Tris pH 7,4.

- **Procedimiento:**

- Preparar un blanco con 2,95 mL de Tampón glicina 50 mM pH 10,2. Preincubar 2 a 3 min, para estabilizar el espectrofotómetro haciendo *scan blank*.
- Preparar 3 tubos con Tampón glicina 50 mM pH 10,2 por cada muestra con: 2,9 mL para el tubo 1; 2,87 mL para el tubo 2 y 2,85 mL para el tubo 3. cada tubo se debe preincubar 2 a 3 min previa lectura.

- **Control:**

- a) Agregar adrenalina 50 μ L.
- b) Leer a 480 nm.

- **Muestra:**

- a) Agregar dilución de la muestra en cada tubo de muestra en la siguiente cantidad:

50 μ L para el tubo 1; 75 μ L para el tubo 2 y 100 μ L para el tubo 3. (Se hace un *scan blank* en cada tubo antes de agregar adrenalina).

b) Agregar adrenalina 50 μ L.

c) Leer a 480 nm.

Se determina la pendiente de la inhibición de la auto-oxidación de la adrenalina. Una unidad de actividad de SOD corresponde a aquella que disminuye la auto-oxidación basal a la mitad.

Finalmente la actividad enzimática de SOD se expresa en: U/g Hb.

5.3.2.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px).

Por técnica espectrofotométrica se midió la cinética de oxidación de NADPH acoplada a la reducción de GSSG a GSH, a 340 nm (Flohé y Günzler, 1984). La técnica se describe a continuación:

- **Reactivos utilizados:**

1. Glutación reductasa (2,4 U/mL): 8125 μ L de Tampón fosfato pH 7,0 + 5 μ L de glutación reductasa.
2. Glutación 10 mM: 9,39 mg de glutación sigma G 4251 en 3 mL de agua destilada.
3. NADPH 1,5 mM: 3,75 mg de NADPH en 3 mL de NaHCO_3 . precalentar en baño termoregulado a 37°C.
4. Peróxido de hidrógeno 1,5 mM: 10 μ L de peróxido de hidrógeno + 58,8 mL de agua destilada.

- **Dilución de la muestra:**

200 μ L de sobrenadante + 1000 μ L de Tampón fosfato.

- **Procedimiento.**

Ensayo no enzimático del blanco.

1. En tubo de ensayos pipetear:
 - 600 μ L de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μ L de solución de glutación reductasa.
 - 100 μ L de solución de azida sódica.
 - 100 μ L de solución de glutación.
2. Agitar en vortex y preincubar 10 min a 37°C. Transferir a cubeta de cuarzo y realizar un *scan blank*. Regresar la solución al tubo.

3. Agregar 100 μL de solución NADPH (preincubado a 37°C), agitar en vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL, para iniciar el registro de lecturas.

Ensayo no enzimático de la muestra.

1. En tubo de ensayos pipetear:
 - 500 μL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μL de solución de glutatión reductasa.
 - 100 μL de solución de azida sódica.
 - 100 μL de solución de glutatión.
2. Agitar en Vortex y preincubar 10 min a 37°C .
3. Agregar
 - 100 μL de solución de NADPH preincubada a 37°C .
 - 100 μL de solución de Peróxido de hidrógeno 1,5 mM.
4. Agitar en Vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL, para iniciar el registro de lecturas.

Ensayo enzimático del blanco

1. En tubo de ensayos pipetear:
 - 500 μL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μL de muestra.
 - 100 μL de solución de glutatión reductasa.
 - 100 μL de solución de azida sódica.
 - 100 μL de solución de glutatión.
2. Agitar en vortex y preincubar 10 min a 37°C . Transferir a cubeta de cuarzo y realizar un *scan blank*. Regresar la solución al tubo.
3. Agregar 100 μL de solución NADPH preincubado a 37°C , agitar en vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL, para iniciar el registro de lecturas.

Ensayo enzimático de la muestra

1. En tubo de ensayos, pipetear:
 - 400 μL de Tampón fosfato pH 7,0.
 - 100 μL de muestra.
 - 100 μL de solución de glutatión reductasa.

- 100 μ L de solución de azida sódica.
 - 100 μ L de solución de glutatión.
2. Agitar en Vortex y preincubar 10 min a 37°C
 3. Agregar
 - 100 μ L de solución de NADPH precalentado a 37°C.
 - 100 μ L de solución de Peróxido de hidrógeno 1,5 mM.
 4. Agitar en Vortex y transferir a cubeta de cuarzo de 1 mL, para iniciar el registro de lecturas.
Finalmente la actividad enzimática de GSH-Px se expresa en: U/g Hb.

5.3.3 Relación GSH/GSSG en hemolizado de eritrocitos:

Se determinó por fluorimetría (Hissin y Hilf, 1976). La técnica se describe a continuación:

- **Reactivos utilizados.**

1. Acido metafosfórico 25%.
2. Tampón fosfato 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0.
3. Solución de O-ftalaldehido (OPT): Concentración 1 mg/mL. Preparar el volumen requerido para el protocolo de cada experimento, disolviendo el reactivo en metanol.
4. Solución de N-etilmaleimida (NEM): Concentración 5 mg/mL. Preparar el volumen requerido para el protocolo de cada experimento, disolviendo el reactivo en Tampón fosfato pH 8,0.

- **Centrifugación**

En tubos de ultracentrífuga se agregan 500 μ L de hemolizado de eritrocitos + 6,3 mL de Tampón fosfato 0,1M EDTA 5 mM pH 8,0 + 1,7 ml de HPO₃ 25%. Se centrifugan a: 100.000 x g durante 30 min.

Se obtiene el sobrenadante, que se utiliza para determinar GSH y GSSG.

Determinación de glutatión reducido (GSH).

1. Dilución: En un tubo de ensayos colocar:
 - 3.000 μ L de sobrenadante.
 - 1.500 μ L de Tampón fosfato pH 8,0.
 Mezclar en vortex.
2. Reacción de desarrollo de fluorescencia: En un tubo de ensayos mezclar:

25 μ L de la dilución + 1875 μ L de Tampón fosfato + 100 μ L de OPT

(El blanco lleva 1900 μ L Tampón fosfato + 100 μ L de OPT)

Mezclar en vortex e incubar a temperatura ambiente durante exactamente 15 min. Luego leer la fluorescencia a 420 nm (excitación a 350 nm).

3. Los valores obtenidos se expresan en μ g de GSH.

Determinación de glutatión oxidado (GSSG).

1. Dilución: mezclar

250 μ L de sobrenadante original.

100 μ L de NEM 0,04 M.

Incubar a temperatura ambiente durante 30 min.

2. Tomar 140 μ L de la dilución + 860 μ L de NaOH 0,1 N. Mezclar en vortex.

3. En tubo de ensayos pipetear:

100 μ L de la mezcla anterior (punto 2).

1800 μ L NaOH 0,1 N.

100 μ L solución de OPT.

(El blanco lleva 1900 μ L de NaOH 0,1 N + 100 μ L solución de OPT)

3. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

4. Leer la fluorescencia a 420 nm (excitación a 350 nm).

5. Los valores obtenidos se expresan en μ g de GSSG.

5.3.4 Lipoperoxidación:

5.3.4.1 Niveles plasmáticos de F₂-isoprostanos

Se determinaron mediante inmunoensayo enzimático (EIA), usando kits (Cayman, Chemical, Ann Arbor, MI) (Collins *et al.*, 1999).

Las muestras de plasma destinadas a la medición de F₂-isoprostanos se recibieron en tubos plásticos impregnados de hidroxitolueno butilado (concentración final 1 mM), como antioxidante.

Se determinó en una muestra de 500 μ L de plasma a la que se aplicó una técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) (Pradelles *et al.*, 1985) utilizando kits para 8-isoprostanos. Las muestras de plasma fueron leídas a 420 nm en un lector de microplacas modelo Sunrise

(Tekan, Salzburgo, Austria). Los resultados fueron expresados como pg de F₂-isoprostanos /mL.

5.3.4.2 Niveles de malondialdehído (MDA) en eritrocitos

Se determinaron por espectrofotometría luego de aplicar la reacción con ácido tiobarbitúrico seguida de extracción con solventes orgánicos (Ohkawa *et al.*, 1979). La técnica realizada se describe a continuación:

- **Reactivos utilizados:**

1. Dodecil sulfato de sodio (SDS) 8,1%.
2. Solución de perfusión: KCl 1,15%.
3. Acido acético 20% pH 3,5.
4. Acido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%.
5. n-butanol-piridina.

- **Procedimiento:**

1. Dilución de la muestra: 100 µL de hemolizado de eritrocitos + 900 µL de KCl 1,15 %.
2. Esta dilución se centrifuga a 600 x g durante 10 min y se obtiene el sobrenadante, que luego se utiliza en la reacción colorimétrica.
3. Reacción colorimétrica. En tubos de ensayo de 10 mL, mezclar:
 - 100 µL de sobrenadante.
 - 100 µL de SDS 8,1% (preincubado).
 - 750 µL ácido acético 20% pH 3,5.
 - 750 µL solución de TBA 0,8% (preincubado).
 - 300 µL H₂O.

(En el blanco se reemplazan los 100 µL de sobrenadante por igual volumen de solución de KCl 1,15% y se continúa el mismo procedimiento).

4. Incubar en baño de agua a 95°C durante 60 min. Posteriormente enfriar en agua durante 10 min.
5. Agregar 500 µL H₂O a todos los tubos y agitar en vortex.
6. Agregar 2,5 mL de n-butanol-piridina a todos los tubos.
7. Agitar vigorosamente sellando previamente con Parafilm.
8. Centrifugar a 2862 x g durante 10 min.

9. Aspirar al menos 2 mL de la fase orgánica (superior) con ayuda de una pipeta automática y transferir a tubos de ensayo que tienen la misma marca.
10. Leer la absorbancia a 532 nm.
 - Los resultados obtenidos se expresan en: nmoles MDA/g Hb.

5.3.5 Determinación de hemoglobina en el glóbulo rojo

Se realizó añadiendo a la muestra de hemolizado de eritrocitos el reactivo de Drabkin, (NaHCO_3 , KCN, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, H_2O), el que al reaccionar con la muestra forma cianometahemoglobina, que da su máxima absorbancia a 540 nm.

- **Reactivos utilizados**

1. Reactivo de Drabkin.
2. Suero fisiológico.

- **Procedimiento**

1. En el tubo blanco se agregan 40 μL de suero fisiológico
2. En cada tubo de muestra se agregan:
 - 5 mL de reactivo de Drabkin.
 - 20 μL de hemolizado de eritrocitos.
 - 20 μL de suero fisiológico
3. Esperar 10 min y leer en espectrofotómetro a 540 nm.
4. Los resultados obtenidos se expresan en: g Hb/mL de hemolizado

5.4 Análisis estadístico.

5.4.1 Determinación del tamaño muestral.

Para determinarlo se utilizó la fórmula “*Tamaño de muestra para estimar diferencias entre medias*” (Snedecor y Cochran, 1986; Programa computacional Win episcope 2,0).

Se ocupó el valor de la media de los controles y se estimó sobre o bajo un 20% de este estadígrafo el valor de la media de los hipertensos, lo que resultó en un tamaño muestral de 52 individuos (Valor de muestra más alto calculado para los niveles de la relación GSH/GSSG), con un nivel de confianza del 95%.

5.4.2 Análisis de datos.

Se aplicó un *Modelo de Regresión Logística Multivariado*, lo que permitió

determinar con un nivel de significancia dado en un 5%, si hay asociación entre los factores estudiados y la presencia de hipertensión arterial esencial. Las correlaciones entre variables se realizaron de acuerdo al test de Pearson, con el mismo nivel de significancia ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS.

6.1 Características de los pacientes.

El estudio se realizó sobre un total de 66 pacientes, de los cuales 35 resultaron ser controles y 31 pacientes hipertensos esenciales.

El cuadro 1 muestra las características clínicas tanto de pacientes controles, como de los hipertensos esenciales seleccionados dentro del protocolo.

El promedio de edad para pacientes controles fue levemente inferior (44,4 años) en relación a los pacientes hipertensos esenciales (45,9 años), no presentando diferencia significativa.

El índice de masa corporal (IMC) registra en ambos tipos de pacientes una cifra promedio inferior a 30 kg/m^2 , requisito básico para descartar pacientes obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$). El IMC de pacientes hipertensos esenciales fue levemente superior (2,7%) al de pacientes controles, no mostrando diferencia significativa.

El valor de glucosa sanguínea, medida en ambos grupos, registra un valor dentro del rango normal (60-100 mg/dL), descartando trastornos en la glicemia como diabetes. El nivel de glucosa sanguínea en pacientes hipertensos fue levemente mayor (3,4%) respecto al grupo control, no presentando diferencia significativa.

Los valores de creatinina sérica medida en ambos grupos, registra valores dentro del rango normal (0,7-1,4 mg/dL). Con esto se descarta la presencia de pacientes con alteraciones renales. El valor de creatinina sérica se encontró levemente aumentado (2,1%) en los pacientes hipertensos respecto a los controles, sin presentar diferencia significativa.

Los valores de colesterol total y triglicéridos, medidos en el suero de ambos grupos, se encuentran dentro de rangos normales (150-250 mg/dL y 0-150 mg/dL, respectivamente), con lo que se descarta alteraciones como hiperlipidemia. Ambos valores se encontraron incrementados (17 y 15% respectivamente) en los pacientes hipertensos esenciales, sin presentar diferencia significativa.

Los valores de presión sistólica media, para pacientes controles, se encuentran dentro del rango fisiológico (100-135 mm Hg.). El mismo valor para pacientes hipertensos esenciales se

encuentra en un rango correspondiente a pre-hipertensión (130-139 mm Hg.). Ambos valores presentan diferencias significativas ($p < 0,001$).

Los valores de presión diastólica media, para pacientes controles, se encuentran dentro del rango fisiológico (60-90 mm Hg.). El mismo valor para pacientes hipertensos esenciales corresponde a la categoría de hipertensión discreta o en estadio 1 (90-95 mm Hg.). Ambos valores presentan diferencias significativas ($p < 0,001$).

La frecuencia cardíaca se presentó levemente incrementada (2,6%) en pacientes hipertensos esenciales, sin diferencia significativa.

El cuadro 2 muestra los valores obtenidos en el grupo control y pacientes HTA correspondientes a defensas antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo, medidos en el plasma y eritrocitos.

Cuadro 1: Características clínicas de sujetos controles V/S pacientes hipertensos esenciales.

Característica	sujetos controles (n = 35)	Pacientes hipertensos esenciales (n = 31)	P
Edad (años)	44,4 ± 7,9	45,9 ± 9,3	0,48
IMC (kg/m ²)	25,5 ± 2,2	26,2 ± 1,9	0,17
glucosa (mg/dL)	89,0 ± 7,3	92,1 ± 10,1	0,16
Creatinina (mg/dL)	0,91 ± 0,11	0,93 ± 0,14	0,52
Colesterol total (mg/dL)	175,5 ± 36,8	187,9 ± 28,2	0,13
Colesterol HDL (mg/dL)	49,9 ± 15,3	46,7 ± 9,1	0,31
Colesterol LDL (mg/dL)	103,9 ± 35,4	112,3 ± 22,9	0,26
Triglicéridos (mg/dL)	117,5 ± 40,2	135,2 ± 45,8	0,10
Resumen presión sistólica media (mm Hg)	119,5 ± 5,0	137,5 ± 9,1	<0,001*
Resumen presión diastólica media (mm Hg)	78,2 ± 4,6	91,9 ± 7,0	<0,001*

Resumen frecuencia cardiaca	71,6 ± 7,6	73,5 ± 6,2	0,28
-----------------------------	------------	------------	------

(latidos/min)

Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar. IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL lipoproteína de baja densidad; * diferencia significativa $p < 0,005$

6.2 Biomarcadores de defensas antioxidantes.

6.2.1 Plasmáticos.

La Fig 1 muestra la capacidad antioxidante medida en el plasma (FRAP) de pacientes controles y pacientes hipertensos esenciales. Los valores respectivos correspondientes a: 427,4 $\mu\text{mol/L} \pm 81,2$ para sujetos controles y de 303,4 $\mu\text{mol/L} \pm 58,3$ para pacientes HTA, se encuentran expresados en el cuadro 2.

La capacidad antioxidante del plasma (FRAP) se encuentra disminuida en un 29 % en pacientes hipertensos esenciales respecto al grupo control, mostrando diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$).

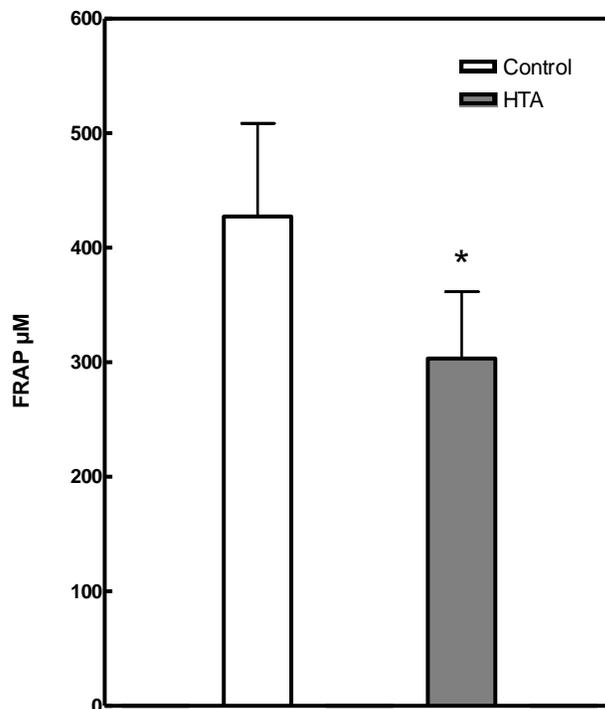


Figura 1: Capacidad antioxidante del plasma (FRAP) medida en pacientes controles y con HTA. 427,4 μmol/L ± 81,2 para sujetos controles y 303,4 μmol/L ± 58,3 para pacientes HTA

Los valores están expresados como promedio ± desviación estándar. *p < 0,05 vs control.

6.2.2 Eritrocitos.

La Fig 2 muestra la actividad de CAT medida en eritrocitos de pacientes controles y de pacientes hipertensos esenciales. Los valores respectivos correspondientes a: $267,2 \text{ k/g Hb} \pm 15,2$ para sujetos controles y de $216,3 \text{ k/g Hb} \pm 11,5$ para pacientes HTA, se encuentran expresados en el cuadro 2.

La actividad enzimática de CAT se encuentra disminuida en un 19% en pacientes hipertensos esenciales respecto a los controles, mostrando diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$).

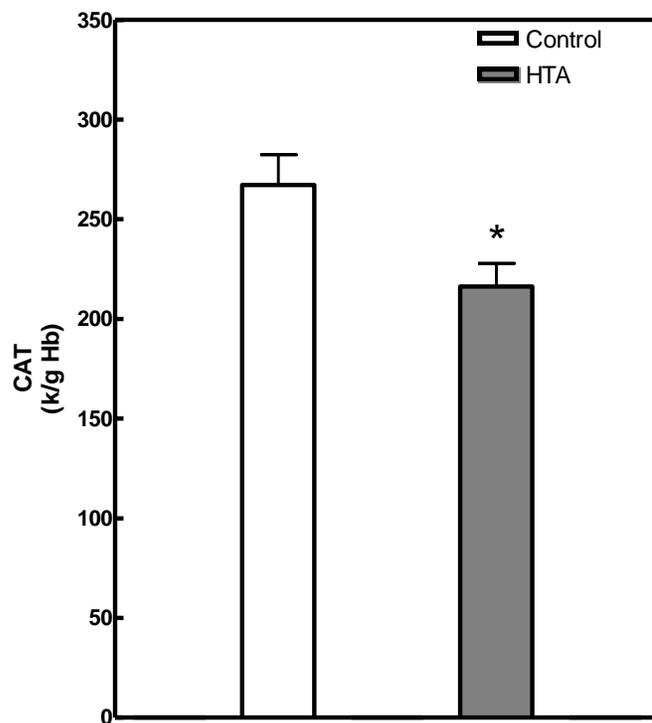


Figura 2: Actividad enzimática de CAT medida en eritrocitos de pacientes controles y con HTA. $267,2 \text{ k/g Hb} \pm 15,2$ para sujetos controles y $216,3 \text{ k/g Hb} \pm 11,5$ para pacientes HTA.

Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs control; k, constante cinética de primer orden de catalasa para la descomposición del peróxido de hidrógeno.

Actividad enzimática expresada por g de hemoglobina (eritrocitos).

La Fig 3 muestra la actividad SOD medida en eritrocitos de pacientes controles y de pacientes hipertensos esenciales. Los valores respectivos correspondientes a: 1355 U/g Hb \pm 49 para sujetos controles y de 1186 U/g Hb \pm 40 para pacientes HTA, se encuentran expresados en el cuadro 2.

La actividad enzimática de SOD se encuentra disminuída en un 12% en pacientes hipertensos esenciales, respecto a sujetos controles, mostrando nuevamente una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$)

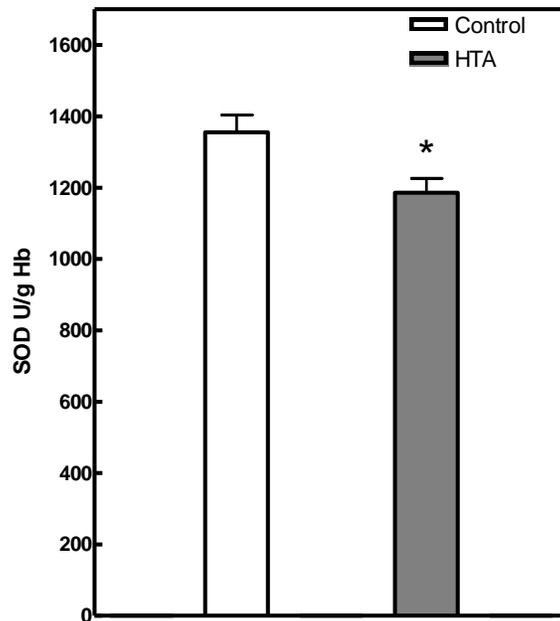


Figura 3: Actividad enzimática de SOD medida en eritrocitos de pacientes controles y con HTA. 1355 U/g Hb \pm 49 para sujetos controles y de 1186 U/g Hb \pm 40 para pacientes HTA.

Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ vs control. Actividad enzimática expresada por g de hemoglobina (eritrocitos).

La fig 4 muestra la actividad de GSH-Px medida en eritrocitos de pacientes controles y en pacientes hipertensos esenciales. Los valores respectivos correspondientes a: 6,23 U/g Hb \pm 0,26 para sujetos controles y de 5,31 U/g Hb \pm 0,19 para pacientes HTA, se encuentra expresados en el cuadro 2.

La actividad enzimática de GSH-Px se encuentra disminuida en un 15% en los pacientes hipertensos esenciales respecto al grupo control, existiendo diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$).

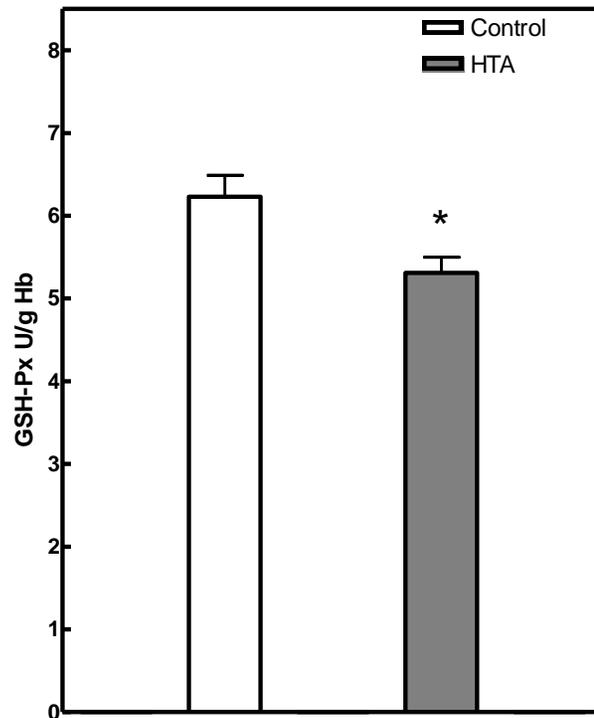


Figura 4: Actividad enzimática de GSH-Px medida en eritrocitos de pacientes controles y con HTA. 6,23 U/g Hb \pm 0,26 para sujetos controles y 5,31 U/g Hb \pm 0,19 para pacientes HTA.

Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs control. Actividad enzimática expresada por g de hemoglobina (eritrocitos).

La relación GSH/GSSG se encontró disminuida en un 7,8% en pacientes hipertensos esenciales respecto a los controles, pero a diferencia de los resultados mencionados anteriormente, esta no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,403$).

6.3 Biomarcadores de estrés oxidativo: lipoperoxidación.

6.3.1 Plasmáticos.

La Fig 5 muestra los valores de F₂-isoprostanos medidos en el plasma de pacientes controles y pacientes hipertensos esenciales. Los valores respectivos correspondientes a: 27,19 pg/mL \pm 7,60 para sujetos controles y de 36,91 \pm 7,04 para pacientes HTA, se encuentran expresados en el cuadro 2.

Los valores de F₂-isoprostanos se encuentran aumentados en un 36% en los pacientes hipertensos esenciales, en comparación al grupo control, mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.001$).

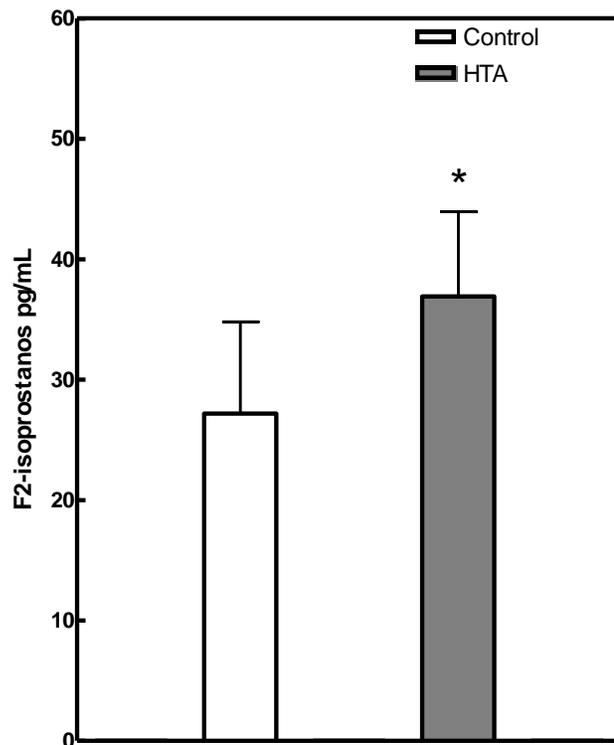


Figura 5: Niveles plasmáticos de F₂-isoprostanos medidos en pacientes controles y con HTA. 27,19 pg/mL \pm 7,60 para sujetos controles y 36,91 \pm 7,04 para pacientes HTA

Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ vs control.

6.3.2 Eritrocitarios.

La fig 6 muestra los valores de MDA medidos en eritrocitos de pacientes controles y pacientes hipertensos esenciales. Los valores respectivos correspondientes a: 311, 2 nmoles/g Hb \pm 18,2 para sujetos controles y de 361,8 nmoles /g Hb \pm 15,2 para pacientes HTA, se encuentran expresados en el cuadro 2.

Los valores de MDA se encuentran aumentados en un 16% en los pacientes hipertensos esenciales, comparados con el grupo control, mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$).

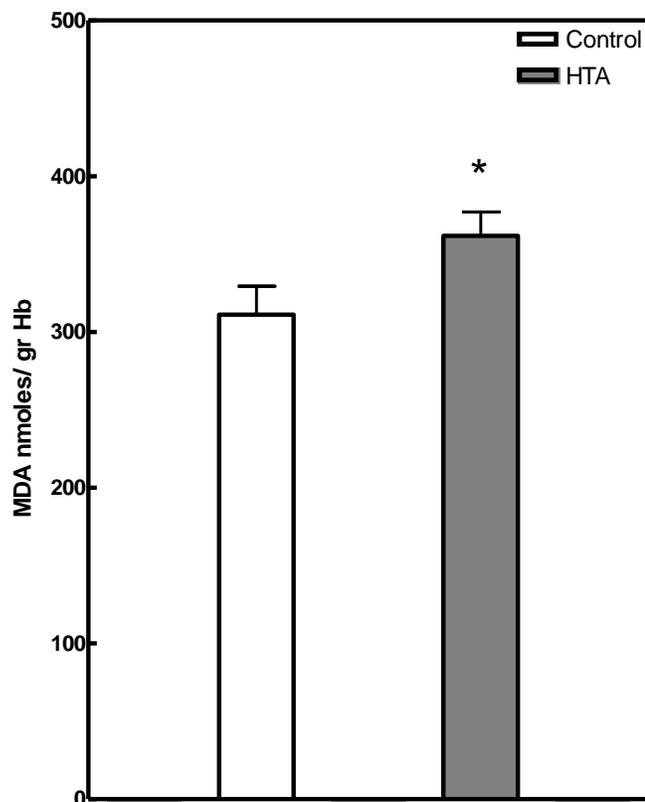


Figura 6: Niveles de MDA medidos en eritrocitos de pacientes controles y con HTA. 311, 2 nmoles/g Hb \pm 18,2 para sujetos controles y 361,8 nmoles /g Hb \pm 15,2 para pacientes HTA.

Los valores están expresados como promedio \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs control. MDA: Malondialdehído, Hb: Hemoglobina.

Cuadro 2: Parámetros bioquímicos de defensas antioxidantes y estrés oxidativo medidos en plasma y sangre de sujetos controles y pacientes con HTA.

Parámetro	Sujetos controles (n = 35)	Pacientes HTA (n = 31)	P
Plasma			
FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	427.4 \pm 81.2	303.4 \pm 58.3	<0.001*
F ₂ -isoprostanos (pg/mL)	27.19 \pm 7.60	36.91 \pm 7.04	<0.001*
Eritrocitos			
CAT (k/g Hb)	267.2 \pm 15.2	216.3 \pm 11.5	<0.001*
SOD (U/g Hb)	1355 \pm 49	1186 \pm 40	<0.001*
GSH-Px (U/g Hb)	6.23 \pm 0.26	5.31 \pm 0.19	<0.001*
MDA (nmoles/g Hb)	311.2 \pm 18.2	361.8 \pm 15.2	< 0.001*
GSH/GSSG	6.38 \pm 2.96	5.88 \pm 1.56	0.403

Los valores están expresados como promedios \pm desviación estándar. U, Unidades; k, constante cinética de primer orden de catalasa para la descomposición del peróxido de hidrógeno. * Diferencia significativa por test de Student para muestras no pareadas.

6.4 Correlaciones establecidas entre presión arterial y defensas antioxidantes para el grupo HTA.

6.4.1 Plasmáticas.

La Fig 7 muestra la asociación existente entre la presión arterial sistólica (PAS) y la diastólica (PAD) con la capacidad antioxidante del plasma (FRAP). Se encontró una correlación negativa entre FRAP con PAS y PAD ($p < 0,001$).

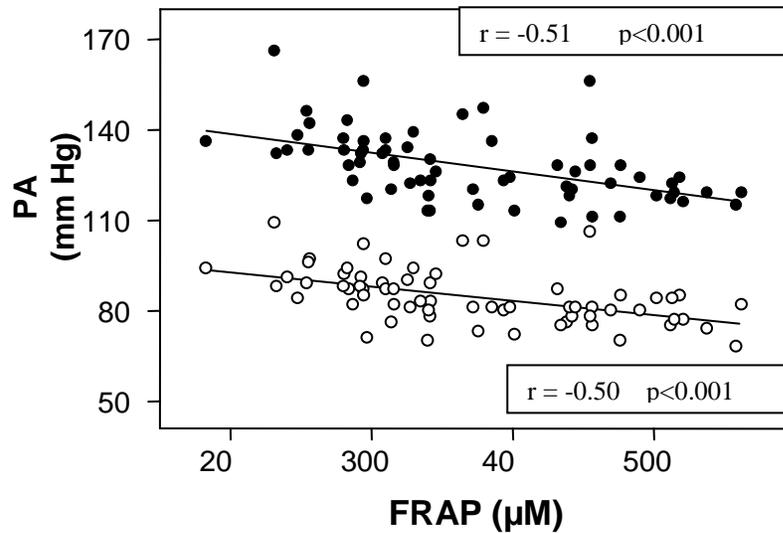


Figura 7. Gráfico de Pearson: correlación de presión arterial sistólica (círculo oscuros y línea) y presión arterial diastólica (círculos blancos y línea) con capacidad antioxidante del plasma (FRAP).

6.4.2 Eritrocitarias.

La Fig 8 muestra la asociación existente entre PAS y PAD con la actividad enzimática de CAT, SOD y GSH-Px. La PAS y PAD fue correlacionada negativamente con la actividad enzimática de CAT (fig 8A) ($p < 0,04$ y $p < 0,005$; respectivamente), SOD (fig 8B) ($p < 0,03$ y $p < 0,01$; respectivamente), y GSH-Px (fig 8C) ($p < 0,04$ y $p < 0,005$; respectivamente).

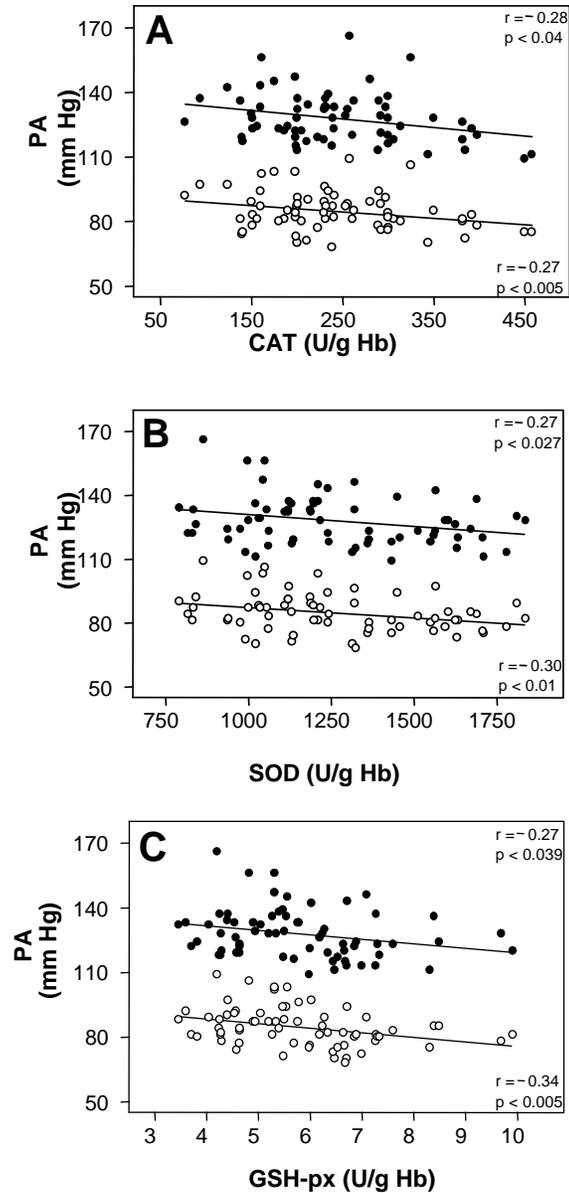


Figura 8. Gráfico de Pearson: correlación de presión arterial sistólica (círculos oscuros y línea) y presión arterial diastólica (círculos blancos y línea) con actividad enzimática de: CAT (8A), SOD (8B), y GSH-Px (8C) en el universo de participantes. PA, presión arterial; U, unidades; Hb, hemoglobina; k, constante cinética de primer orden de catalasa para la descomposición del peróxido de hidrógeno.

6.5 Correlaciones establecidas entre presión arterial y biomarcadores de estrés oxidativo para el grupo HTA: Lipoperoxidación.

6.5.1 Plasmáticos

La Fig 9A muestra la asociación existente entre PAS y PAD con los niveles de F₂-isoprostanos. En contraste a las asociaciones establecidas con los parámetros de defensa antioxidante, aquí se encontró una correlación positiva entre PAS y PAD con los niveles plasmáticos de F₂-isoprostanos ($p < 0,002$ y $p < 0,0001$; respectivamente).

6.5.2 Eritrocitarios

La Fig 9B muestra la asociación existente entre PAS y PAD con los niveles de MDA. Aquí se vuelve a encontrar una correlación positiva entre PAS y PAD con este parámetro eritrocitario de lipoperoxidación ($p < 0,05$ y $p < 0,02$; respectivamente).

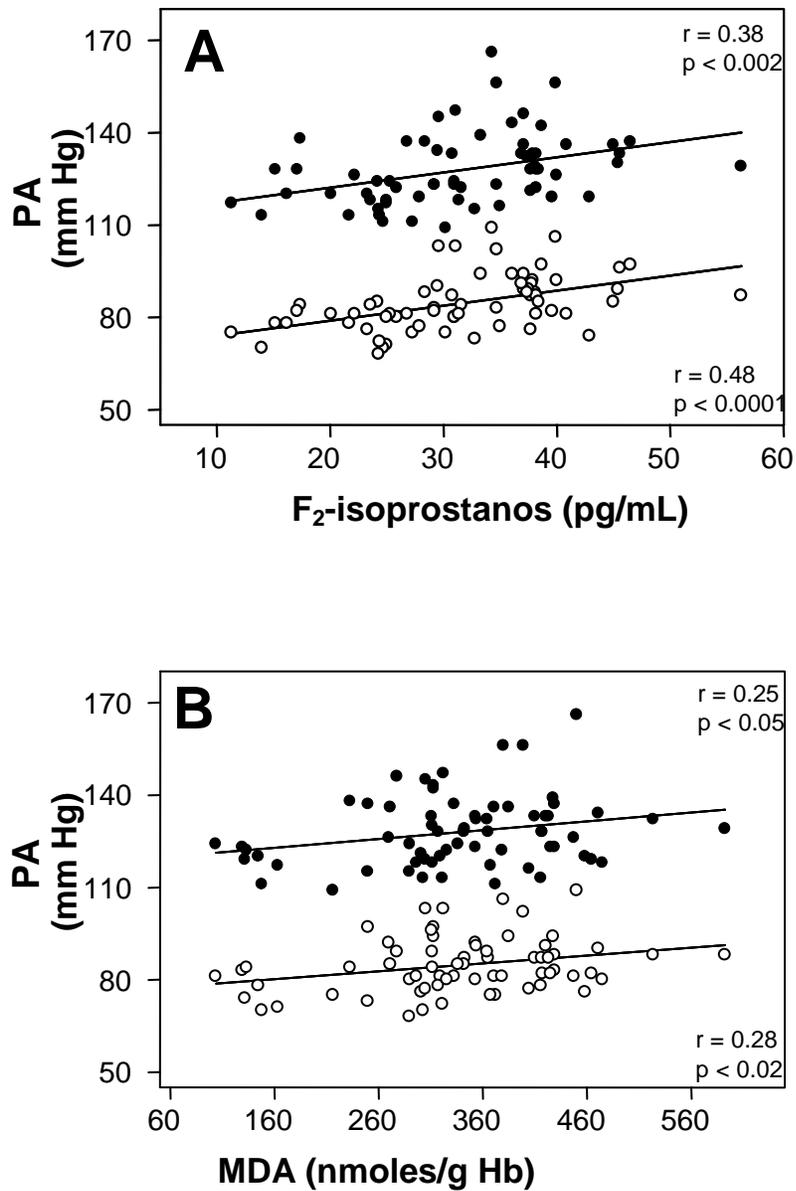


Figura 9. Gráfico de Pearson: correlación de presión arterial sistólica (esferas oscuras y línea) y presión arterial diastólica (esferas blancas y línea) con lipoperoxidación medida en el plasma (niveles de F₂-isoprostanos Fig. 9A) y eritrocitos (niveles de MDA Fig. 9B) del universo de participantes. PA, Presión Arterial; MDA, malondialdehído.

7. DISCUSIÓN.

Este estudio proporciona información acerca de la influencia ejercida por el estrés oxidativo y que podría explicar el mecanismo de la HTA esencial, medido a través de parámetros de defensa antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se produce por un desbalance entre los mecanismos formadores de especies reactivas del oxígeno (EROS) y las defensas antioxidantes, lo que puede llevar a daño potencial sobre las biomoléculas.

Las evidencias indican que los radicales libres están implicados en la patogenia de la hipertensión arterial esencial por alteración en la función endotelial (Tandon *et al.*, 2005).

El aumento de EROS por sobre las defensas antioxidantes tanto endógenas como exógenas, trae como consecuencia daño sobre las biomoléculas, siendo los fosfolípidos de membrana los más susceptibles. El daño oxidativo producido sobre lípidos, conocido como lipoperoxidación, se puede conocer, mediante la medición de biomarcadores presentes en el glóbulo rojo como el malondialdehído (MDA) y medición de niveles plasmáticos de F₂-isoprotanos.

El MDA corresponde al producto final de la degradación no enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados y, al ser una molécula altamente reactiva, su incremento podría llevar a daños sobre las membranas y finalmente injuria celular. Los F₂-isoprostanos, corresponden a marcadores plasmáticos de lipoperoxidación. Estos compuestos químicamente semejantes a prostaglandinas se forman de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico, catalizada por radicales libres, y poseen marcados efectos hemodinámicos tales como: disminución de velocidad de filtración glomerular, aumento de la mitogénesis en la musculatura lisa de la pared vascular y promotor de la liberación de sustancias vasoactivas vasoconstrictoras como endotelina-1. Esto lleva a disfunción vascular y con ello alteración en la regulación de la presión arterial.

Existen evidencias, que indican un aumento significativo en los niveles de MDA, medidos en eritrocitos de pacientes hipertensos mayores de edad (69-91 años), respecto a normotensos sanos de la misma edad (Kedziora-Kornatowska *et al.*, 2006), lo cual concuerda con los resultados encontrados para los pacientes hipertensos en nuestro estudio, aunque estos no presentaron un rango de edad tan avanzado. Sin embargo, otro estudio indicó que, en pacientes con HTA esencial no se encontraron niveles elevados en los marcadores de lipoperoxidación, en etapas tempranas de la enfermedad, cuando los pacientes presentaron una hipertensión de leve a moderada (Cracowski *et al.*, 2003). Para este caso, se debe

considerar que la medición de F₂-isoprostanos se realizó en orina y no en plasma como los pacientes evaluados en nuestro estudio, los que además de poseer niveles mayores de F₂-isoprostanos plasmáticos, presentaron estadios menores de hipertensión arterial (prehipertensión para PAS e hipertensión leve para PAD).

Dentro de las defensas antioxidantes propias del organismo, las enzimas antioxidantes (CAT, SOD Y GSH-Px) desempeñan un papel fundamental constituyendo la primera línea de defensa contra los radicales libres, proceso que realizan mediante la conversión de estas especies químicas hacia otras de menor reactividad, protegiendo con ello del daño oxidativo sobre biomoléculas. Por lo tanto, el estado de estrés oxidativo que se produce en este caso puede ser sustentado por la menor actividad enzimática de estas enzimas presentes en el eritrocito.

El estudio realizado por otros autores mostró una marcada disminución de la actividad enzimática en pacientes con HTA, respecto a normotensos sanos (Kashyap *et al.*, 2005), que a diferencia del nuestro incluye individuos de ambos sexos con un rango de edad mayor (18 a 65 años), pero pese a ello coincide con nuestros resultados. Por otra parte, una investigación no encontró diferencia significativa para las enzimas CAT y GSH-Px entre pacientes hipertensos y normotensos sanos (Kedziora-Kornatowska *et al.*, 2004). Cabe considerar que se realizó una comparación entre grupos de pacientes ancianos hipertensos y normotensos y a su vez, ancianos hipertensos y jóvenes normotensos (61-91 años para pacientes ancianos hipertensos, 61-97 años para pacientes ancianos normotensos, y 23-48 años para jóvenes normotensos). Se atribuyó la pequeña diferencia entre la actividad enzimática de estas enzimas a la escasez de cofactores enzimáticos como por ejemplo, el selenio para el caso de la GSH-Px. Puesto que se encontró diferencia significativa con el grupo joven, se evidenció una correlación negativa de la actividad enzimática con la edad.

Además, se pueden hacer mediciones de defensas antioxidantes no enzimáticas, las que pueden ser realizadas evaluando las concentraciones de antioxidantes específicos o midiendo la capacidad antioxidante total de un fluido biológico o un tejido. Es así como el método FRAP (ferric reducing ability of plasma) mide la capacidad que posee el plasma de reducir el ión ferrico a ferroso. Bajo un estado de estrés oxidativo, donde predominan las EROS, esta capacidad antioxidante se ve sobrepasada, con lo cual sus valores disminuyen.

Bajo estas circunstancias, los estudios muestran una correlación negativa de FRAP respecto a los valores de presión arterial (Kashyap *et al.*, 2005). Así mismo existen antecedentes que refuerzan este postulado, en los cuales se han demostrado niveles

disminuídos de defensas antioxidantes no enzimáticas como la vitamina C en pacientes HTA, mostrando asociación entre los valores plasmáticos de Vitamina C con los valores de presión arterial (Ness *et al*, 1996), aunque en dicho estudio no se especifica la exclusión rigurosa de pacientes con factores de riesgo inductores de estrés oxidativo u otros factores que pudiesen alterar los resultados (fumadores, obesos, diabéticos, con medicación actual, entre otros). Así nuestros resultados, coincidentes con lo anterior, permitieron realizar un acercamiento más exacto del papel que desempeñan los parámetros relacionados con estrés oxidativo en la modulación de la presión arterial.

Así se evidencia que bajo un estado de estrés oxidativo, se comprueba una significativa disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, lo que puede a su vez, ser relacionado con la presentación de HTA esencial.

El glutatión (GSH), es el mayor tiol no proteínico implicado en muchas funciones celulares. Este tripéptido (g-glutamyl-L-cisteyl-glycine) juega un papel central en la protección de las células frente a los radicales libres y frente a intermediarios reactivos del oxígeno. El glutatión existe en dos formas, reducido (GSH) y oxidado (GSSG), las que habitualmente se encuentran en equilibrio.

Bajo condiciones de estrés oxidativo, las EROS oxidan GSH A GSSG, produciendo una disminución en la concentración de GSH y un incremento en la concentración de GSSG.

Estudios revelan que en individuos con HTA esencial, la relación GSH/GSSG se encuentra significativamente disminuida en comparación a sujetos normotensos (Redon *et al.*, 2003). Este resultado, reflejo de una condición de estrés oxidativo, se encuentra también en nuestros datos, pero no presenta una diferencia significativa entre ambos grupos.

Con estos resultados se demuestra que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la injuria celular afectando diversos órganos y sus funciones. De hecho ha sido implicado en diversas enfermedades como el alzheimer, cáncer, pre-eclampsia, entre otras. En el caso de la hipertensión arterial esencial, la principal alteración que se reconoce es la disfunción endotelial. La función endotelial se mide por la respuesta vasodilatadora capaz de presentar el endotelio frente a estímulos como el *shear* estrés, mediante la liberación de mediadores vasoactivos vasodilatadores como el óxido nítrico o prostaciclina, o mediante mediadores vasoactivos vasoconstrictores como la endotelina-1. En condiciones normales ambos tipos de mediadores se encuentran en un balance regulado, que bajo un estado en el que se produce un aumento en la formación de radicales libres y disminución en su depuración, este balance se desplaza hacia la formación de los vasoconstrictores o hacia un

aumento en la sensibilidad de estos, acto que puede ser reforzado, mediante el incremento en la lipoperoxidación con lo cual, aumentan los productos de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico llamados F₂-isoprostanos, que estimulan la liberación de endotelina-1. Por otra parte, la angiotensina II puede ejercer un efecto hipertensivo a largo plazo, ya que al estimular a la NADPH oxidasa, esta lleva a la formación del radical superóxido, el cual es capaz de inactivar al óxido nítrico mediante la formación de peroxinitrito, radical nitrogenado altamente reactivo, que tiene la capacidad de oxidar al ácido araquidónico llevando a la formación de F₂-isoprostanos y con ello todos los efectos biológicos mencionados anteriormente.

Es así como la evidencia científica, comprobada comprobada a través de la medición en plasma y eritrocitos de los distintos biomarcadores de estrés oxidativo y el daño que estos ejercen sobre las defensas antioxidantes, ha permitido correlacionarlos con las cifras de presión arterial, lo que permitiría formular terapias antioxidantes, tendientes a controlar la causa de fondo, que son los radicales libres.

8. CONCLUSIONES.

La hipertensión arterial esencial puede ser atribuida a la ocurrencia de estrés oxidativo en el organismo, donde se produce un desbalance entre las sustancias antioxidantes y prooxidantes a favor de estas últimas, lo que pudo ser comprobado en este trabajo mediante la medición en plasma y sangre de distintos biomarcadores de esta alteración.

Es así como este trastorno se reflejó mediante una disminución en la capacidad antioxidante del plasma y a nivel eritrocitario mediante una menor actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT Y GSH-Px. Por otra parte, también se presentó un aumento de la lipoperoxidación, mediante los incrementos de F₂-isoprostanos en el plasma y de la concentración de MDA en el eritrocito.

Dichos resultados pudieron ser correlacionados efectivamente con las cifras de presión arterial, lo que confirma el importante papel que juega el estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad.

Esto permitiría establecer las bases para instaurar un tratamiento antioxidante que pudiese contrarrestar el exceso de radicales libres con lo cual se mejoraría la función endotelial, disminuiría el daño sobre las biomoléculas resultando en una disminución en las cifras de presión arterial, y como beneficio adjunto prevenir la aparición de otras enfermedades crónicas mediadas por estrés oxidativo.

El estudio se acotó al sexo masculino debido a las diferencias hormonales producidas en la mujer durante el ciclo menstrual, dada la predominancia de estrógeno o progesterona según la etapa, las cuales pueden incidir efectivamente en el estrés oxidativo y en los resultados obtenidos para los fines de esta investigación, por lo que se debería considerar dicha diferencia para estandarizar los valores obtenidos referentes a estrés oxidativo en HTA.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Aebi, H. 1974. Catalase In: Methods in Enzymatic Analysis. Bergmeyer H.U. 29th ed. Academic Press, New York. pp. 673-678.

Agapitov, A.V.; Haynes, W.G. 2002. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 3:1-15.

Alonso, D.; Radomski, M.W. 2003. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev.* 8:107-115.

Amiri, F.; Viridis, A.; Neves, M.F.; Iglarz, M.; Seidah, N.G.; Touyz, R.M.; Reudelhuber, T.L.; Schiffrin, E.L. 2004. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation.* 12;110:2233-2240.

Beilin L.J.; Puddey, I.B.; Burke, V. 1996. Alcohol and hipertensión--kill or cure?. *J. Hum. Hypertens.* 10 Supl. 2: S1-S5.

Benzie, I.; Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.

Blann, A.D.; Tse, W.; Maxwell, S.J.; Waite, M.A. 1994. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J. Hypertens.* 12:925-928.

Brown, M. 2003. Better blood pressure control: how to combine drugs. *J. Hum. Hipertens.* 17: 81-86.

Cabassi, A.; Dumont, E.C.; Girouard, H.; Bouchard, J.F.; Le Jossec, M.; Lamontagne, D.; Besner, J.G.; de Champlain, J. 2001. Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats. *J. Hypertens.* 19:1233-1244.

Cai, H.; Harrison, D.G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87:840-844.

Cardillo, C.; Campia, U.; Kilcoyne, C.M.; Bryant, M.B.; Panza, J.A. 2002. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation.* 105:452-456.

Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bull.* 49:481-493.

Chobanian, A.V.; Bakris, G.L.; Black, H.R.; Cushman, W.C.; Green, L.A.; Izzo, J.L.; Jones, D.W.; Materson, B.J.; Oparil, S.; Wright, J.T.; Roccella, E.J. 2003. The seventh report of the Joint National Committee on Preventions, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *J. Am. Med. Assoc.* 289:2560-2572.

Collins, C.; Quaggiotto, P.; Wood, L.; O'Loughlin, E.; Henry, R.; Garg, M. 1999. Elevated plasma levels of F2 α isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids*. 34:551-556.

Cosentino, F.; Lüscher, T. 2001. Effects of blood pressure and glucose on endothelial function. *Curr. Hypertens. Rep.* 3:79-88.

Cracowski, J.L. ; Devillier, P. ; Durand, T. ; Stanke-Labesque, F. ; Bessard, G. 2001. Vascular Biology of the isoprostanes. *J. Vasc. Res.* 38:93-103.

Cracowski, J.L; Baguet, J.P; Ormezzano, O.; Bessard, J.; Stanke-Labesque, F.; Bessard, G.; Mallion, J.M. 2003. Lipid peroxidation is not increased in patients with untreated mild-to-moderate hypertension. *Hypertension* 41:286-288.

Dohi, Y.; Hahn, A.W.; Boulanger, C.M.; Buhler, F.R.; Luscher, T.F. 1992. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 19:131-137.

Esper, R.J.; Nordaby, R.A.; Vilarino, J.O.; Paragano, A.; Cacharron, J.L.; Machado, R.A. 2006. The Endothelial Dysfunction. *Cardiovasc. Diabetol.* 23;5(1):4.

Ferroni, P.; Basili, S.; Paoletti, V.; Davi, G. 2006. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 16:222-233.

Flohé, L.; Günzler, W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. In: Colowic SP, Kaplan NO (Eds.). *Methods in Enzymology* Vol. 105. Academic Press, New York. pp. 114-121.

Freestone, S.; Yeo, W.; Ramsay, L. 1995. Effect of coffee and cigarette smoking on the blood pressure of patients with accelerated (malignant) hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 9:89-91.

Fukunaga, M.; Makita, N.; Roberts, L.J. 2nd.; Morrow, J.D.; Takahashi, K.; Badr, K.F. 1993. Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 264(6 Pt 1):C1619-1624.

Fukunaga, M.; Yura, T.; Badr, K.F. 1995. Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2 alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (Suppl 3):S51-52.

Gillman, M.W.; Kannel, W.B.; Belanger, A.; D'Agostino, R.B. 1993. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. *Am. Heart. J.* 125:1148-1154.

Girouard, H.; Chulak, C.; LeJossec, M.; Lamontagne, D.; de Champlain, J. 2003. Chronic antioxidant treatment improves sympathetic functions and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 21:179-188.

Gokce N. 2004. L-arginine and hypertension. *J. Nutr.* 134(10 Suppl):2807S-2811S; discussion.2818S-2819S.

Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899:136-147.

Haas, J.A.; Krier, J.D.; Bolterman, R.J.; Juncos, L.A.; Romero, J.C. 1999. Low-dose angiotensin II increases free isoprostane levels in plasma. *Hipertensi3n* 34(4 Pt 2):983-986.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free. Radic. Biol. Med.* 18:125-126.

Hirsch, S.; De la Maza, P.; Yánez, P.; Glasinovic, A.; Petermann, M.; Barrera, G.; Gattas, V.; Escobar, E.; Bunout, D. 2002. Hyperhomocysteinemia and endothelial function in young subjects: effects of vitamin supplementation. *Clin. Cardiol.* 5:495-501.

Hissin, P.; Hilf, R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74:214-226.

INTERSALT: Cooperative Research Group. 1988. Sodium, potassium, body mass, alcohol and blood pressure: the INTERSALT study. *J. Hypertens.*6 (Supl. 4): S584-586.

Jacobs, P.; Wood, L.; Bick, R. 2006. Homocysteine in vascular disease: an emerging clinical perspective. *Cardiovasc. J. S. Afr.* 17:135-139.

Kannel, W.B.; Higgins, M. 1990. Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. *J. Hypertens.* 8:S3-8.

Kashyap, M.K.; Yadav, V.; Sherawat, B.S.; Jain S, Kumari S.; Khullar, M.; Sharma, P.C.; Nath, R. 2005. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 277:89-99.

Kedziora-Kornatowska, K.; Czuczejko, J.; Pawluk, H.; Kornatowski, T.; Motyl, J.; Szadujkis-Szadurski, L.; Szewczyk-Golec, K.; Kedziora, J. 2004. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cell Mol Biol Lett.* 9(4A):635-641.

Kedziora-Kornatowska, K.; Kornatowski, T.; Bartosz, G.; Pawluk, H.; Czuczejko, J.; Kedziora, J.; Szadujkis-Szadurski, L. 2006. Production of nitric oxide, lipid peroxidation and oxidase activity of ceruloplasmin in blood of elderly patients with primary hypertension. Effects of perindopril treatment. *Aging. Clin. Exp. Res.*18:1-6.

Klingbeil, A.U.; John, S.; Schneider, M.P.; Jacobi, J.; Handrock, R.; Schmieder, R.E. 2003. Effect of AT1 receptor blockade on endothelial function in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*16:123-128.

Kooy, N.W.; Lewis, S.J. 1996. Elevation in arterial blood pressure following the development of tachyphylaxis to peroxynitrite. *Eur. J. Pharmacol.* 307:R5-7.

Krousel-Wood, M.A.; Muntner, P.; He, J.; Whelton, P.K. 2004. Primary prevention of essential hypertension. *Med. Clin. North. Am.* 88:223-238.

Laroia, S.T.; Ganti, A.K.; Laroia, A.T.; Tendulkar, K.K. 2003. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. *Int. J. Cardiol.* 88:1-9.

Lasségue, B.; Girendling, K. 2004. Reactive oxygen species in hypertension. *Am. J. Hypertens.* 17:852-860.

Li, L.; Fink, G.D.; Watts, S.W.; Northcott, C.A.; Galligan, J.J.; Pagano, P.J.; Chen, A.F. 2003. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 107:1053-1058.

Luscher, T.F.; Boulanger, C.M.; Dohi, Y.; Yang, Z.H. 1992. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19:117-130.

Luscher, T.F.; Seo, B.G.; Buhler, F.R. 1993. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* 21(6 Pt 1):752-757.

Mahmud, A.; Feely, J. 2004. Arterial stiffness and the renin-angiotensin-aldosterone system. *J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst.* 5:102-108.

Maicas, C.; Lázaro, E.; Alcalá, J.; Hernández, P.; Rodríguez, L. 2003. Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. Servicio de Cardiología. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. Sociedad castellana de cardiología. *Monocardio* N.º 3. Vol. V: 141-160.

Masatsugu, K.; Itoh, H.; Chun, T.H.; Saito, T.; Yamashita, J.; Doi, K.; Inoue, M.; Sawada, N.; Fukunaga, Y.; Sakaguchi, S.; Sone, M.; Yamahara, K.; Yurugi, T.; Nakao, K. 2003. Shear stress attenuates endothelin and endothelin-converting enzyme expression through oxidative stress. *Regul. Pept.* 111:13-19.

Mihailovic, M.; Avramovic, D.; Jovanovic, I.; Pesut, O.; Matic, D.; Stojanov, V. 1998. Blood and plasma selenium levels and GSH-Px activities in patients with arterial hypertension and chronic heart disease. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17:285-289.

Misra, H.; Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anión in the antioxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170-3175.

Morrow, J.D.; Hill, K.E.; Burk, R.F.; Nammour, T.M.; Badr, K.F.; Roberts, L.J. 2nd. 1990. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:9383-9387.

Nadar, S.; Blann, A.D.; Lip, G.Y. 2004. Endothelial dysfunction: methods of assessment and application to hypertension. *Curr. Pharm. Des.* 10:3591-3605.

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

Ness, A.R.; Khaw, K.T.; Bingham, S.; Day, N.E. 1996. Vitamin C status and blood pressure. *J. Hypertens.* 14:503-508.

Nicolson, D.J.; Dickinson, H.O.; Campbell, F.; Mason, J.M. 2004. Lifestyle interventions or drugs for patients with essential hypertension: a systematic review. *J. Hypertens.* 22:2043-2048.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358.

Orth, S. 2002. Smoking and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:1663-1672.

Ortiz, M.C.; Manriquez, M.C.; Romero, J.C.; Juncos, L.A. 2001. Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension* 38(3 Pt 2):655-659.

Parissis, J.T.; Venetsanou, K.F.; Mentzikof, D.G.; Kalantzi, M.V.; Georgopoulou, M.V.; Chrisopoulos, N.; Karas, S.M. 2001. Plasma levels of soluble cellular adhesion molecules in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *Eur. J. Intern. Med.* 12:350-356.

Pedrinelli, R.; Giampietro, O.; Carmassi, F.; Melillo, E.; Dell'Omo, G.; Catapano, G.; Matteucci, E.; Talarico, L.; Morale, M.; De Negri, F.; et al. 1994. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet* 344(8914):14-18.

Pradelles, P.; Grassi, J.; Maclouf, J. 1985. Enzyme immunoassay of eicosanoids using AchE as label. An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* 57:1170-1173.

Prático, D. 2005. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis* 181:215-224.

Preston, R.A.; Ledford, M.; Materson, B.J.; Baltodano, N.M.; Memon, A.; Alonso, A. 2002. Effects of severe, uncontrolled hypertension on endothelial activation: soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor. *J Hypertens.* 20:871-877.

Pryor, W.; Squadrito, G. 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268:L699-L722.

Rayo I.; Marín E. 1999. Vino y corazón. *Rev. Esp. Cardiol.* 52: 228-285.

Reckelhoff, J.F.; Romero, J.C. 2003. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284:R893-R912.

Redon, J.; Oliva, M.R.; Tormos, C.; Giner, V.; Chaves, J.; Iradi, A.; Saez, G.T. 2003. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 41:1096-1101.

Rodrigo, R.; Passalacqua, W.; Araya, J.; Orellana, M.; Rivera, G. 2003. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42:453-461.

Rodrigo, R.; Rivera, G. 2003. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (Monografía). Laboratorio de

fisiopatología renal; programa de farmacología molecular y clínica; instituto de ciencias biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. pp. 1-27.

Ruef, J.; Moser, M.; Kubler, W.; Bode, C. 2001 Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Pathol.* 10:311-315.

Sato, M.; Yanagisawa, H.; Nojima, Y.; Tamura, J.; Wada, O. 2002. Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase. *Clin. Exp. Hypertens.* 24:355-370.

Schlaich, M.P.; Parnell, M.M.; Ahlers, B.A.; Finch, S.; Marshall, T.; Zhang, W.Z.; Kaye, D.M. 2004. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation* 110:3680-3686.

Sies, H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69:965-968.

Simonson, M.S.; Wann, S.; Mene, P.; Dubyak, G.R.; Kester, M.; Nakazato, Y.; Sedor, JR.; Dunn, M.J. 1989. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 83:708-712.

Singhal, P.K.; Khaper, N.; Palace, V.; Kumar, D. 1998. The role of oxidative stress in genesis of heart disease. *Cardiovas. res.* 40:426-432.

Schnackenberg, C.G.; Wilcox, C.S. 1999. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin F₂α. *Hypertension* 33:424-428.

Schnackenberg, C.G. 2002a. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2:121-125.

Schnackenberg, C.G. 2002b. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282:R335-R342.

Shokoji, T.; Nishiyama, A.; Fujisawa, Y.; Hitomi, H.; Kiyomoto, H.; Takahashi, N.; Kimura, S.; Kohno M.; Abe, Y. 2003. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41:266-273.

Snedecor, G.; Cochran, W. 1986. *Statistical methods* 7^a edition. The Iowa State University Press. ISBN: 8138:1560-1566.

Taddei, S.; Viridis, A.; Ghiadoni, L.; Versari, D.; Salvetti, A. 2006. Endothelium, aging, and hypertension. *Curr. Hypertens.* 8:84-89.

Takahashi, K.; Nammour, T.M.; Fukunaga, M.; Ebert, J.; Morrow, J.D.; Roberts, L.J. 2nd.; Hoover, R.L.; Badr, K.F. 1992. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂ α, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J. Clin. Invest.* 90:136-141.

Tandon, R.; Sinha, M.K.; Garg, H.; Khanna, R.; Khanna, H.D. 2005. Oxidative stress in patients with essential hypertension. *Natl. Med. J. India.* 18:297-299.

Tsuji, H.; Venditti, F.J. Jr.; Manders, E.S.; Evans, J.C.; Larson, M.G.; Feldman, C.L.; Levy, D. 1994. Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Circulation* 90:878-883.

Van Guldener, C.; Nanayakkara, P.W.; Stehouwer, C.D. 2003. Homocysteine and blood pressure. *Curr. Hypertens. Rep.*5:26-31.

Vaziri, N.D.; Dicus, M.; Ho, N.D.; Boroujerdi-Rad, L.; Sindhu, R.K. 2003a. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 63:179-185.

Vaziri, N.D.; Lin, C.Y.; Farmand, F.; Sindhu, R.K. 2003b. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney. int.* 63:186-194.

Wattanapitayakul, S.K.; Weinstein, D.M.; Holycross, B.J.; Bauer, J.A. 2000. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J.* 14:271-278.

White, C.R.; Brock, T.A.; Chang, L.Y.; Crapo, J.; Briscoe, P.; Ku, D.; Bradley, W.A.; Gianturco, S.H.; Gore, J.; Freeman, B.A.; et al. 1994. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:1044-1048.

Witte, D.R.; Broekmans, W.M.; Kardinaal, A.F.; Klopping-Ketelaars, I.A.; van Poppel, G.; Bots, M.L.; Kluft, C.; Princen, J.M. 2003. Soluble intercellular adhesion molecule 1 and flow-mediated dilatation are related to the estimated risk of coronary heart disease independently from each other. *Atherosclerosis* 170:147-153.

Wojcicka, G.; Beltowski, J.; Jamroz, A. 2004. Oxidative stress in hypertension. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* 31;58:183-193.

Yamada, M.; Omata, K.; Abe, F.; Ito, S.; Abe, K. 1999. Changes in prostacyclin, thromboxane A₂ and F₂-isoprostanes, and influence of eicosapentaenoic acid and antiplatelet agents in patients with hypertension and hyperlipidemia. *Immunopharmacology* 44:193-198.

Yura, T.; Fukunaga, M.; Khan, R.; Nassar, G.N.; Badr, K.F.; Montero, A. 1999. Free-radical-generated F₂-isoprostanone stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney. Int.* 56:471-478.

Zoccali, C.; Maio, R.; Mallamaci, F.; Sesti, G.; Perticone, F. 2006. Uric Acid and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol.*17:1466-1471.

Zou, M.; Jendral, M.; Ullrich, V. 1999. Prostaglandin endoperoxide-dependent vasospasm in bovine coronary arteries after nitration of prostacyclin synthase. *Br. J. Pharmacol.* 126:1283-1292.