
El efecto de nefroprotección de los calcio-antagonistas: una contribución al conocimiento de su probable mecanismo.

José A. Colina-Araujo¹, Nereyda Godoy-Godoy², José A. Colina-Chourio^{3,4}, Raquel Ávila³ y Tibusay Rincón⁴.

¹Postgrado de Medicina Interna, Hospital Universitario de Maracaibo, Cátedras de
²Clínica Médica, ³Farmacología y ⁴Fisiología, Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Nefroprotección, calcio-antagonistas, IECA, presión arterial, hormonas renales, calicreínas, renina, óxido nítrico, prostaglandinas.

Resumen. La prevalencia e incidencia de la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) han ido aumentando progresivamente en los últimos 20 años, y tanto la Hipertensión Arterial (HTA) como la Diabetes Mellitus (DM) son las dos causas más importantes de ambas situaciones. Los cambios hemodinámicos y metabólicos contribuyen en el desarrollo y progresión de la enfermedad renal en ambas HTA y DM, que son factores claves en la nefropatía. La reducción de la presión arterial sola no es suficiente para una máxima protección renal, de allí la necesidad del conocimiento de un mecanismo adicional para la nefroprotección para establecer medidas preventivas. A manera de contribuir al conocimiento de tal mecanismo nefroprotector de las drogas calcio-antagonistas (CA) del grupo dihidropiridinas se realizó este estudio prospectivo, experimental y longitudinal controlado con placebo en 55 adultos normotensos e hipertensos no-diabéticos que recibieron 3 drogas antihipertensivas CA a monodosis matutinas. Se dividieron en 3 grupos. Grupo A (n = 25): Control, normotensos, que recibieron dosis única de 20 mg de Nitrendipina (NIT). Grupo B (n = 15): Hipertensos tipos I y II que recibieron dosis de 20 mg de Nifedipina (NIF) por 12 semanas y Grupo C (n = 15): Hipertensos tipo I y II que recibieron monodosis de Amlodipina (AML) de 5 mg/d durante 1 semana. En conjunto con las respuestas clínica y hemodinámica, se analizaron parámetros bioquímicos como hormonas vasoactivas renales renina, prostaglandinas, calicreínas y óxido nítrico y también cGMP. El efecto antihipertensivo de los CA se confirmó, y hubo un aumento significativo de la excreción urinaria de calicreínas relacionado con el aumento del óxido nítrico. Se concluye que el efecto nefroprotector de los CA puede ser debido a su capacidad para estimular las calicreínas urinarias quienes a su vez estimulan el óxido nítrico; también

se sugiere continuar con este tipo de investigaciones con mayor número de pacientes hipertensos y diabéticos con nefropatía, y estudios clínicos de mayor duración.

**Nephroprotection from calcium channels blocking agents:
A contribution to their probable mechanism of action.**

Invest Clín 2008; 49(2): 369 - 385

Key words: Nephroprotection, calcium channels blocking agents, hypertension, renal hormones, kallikreins, nitric oxide.

Abstract. The prevalence and incidence of end-stage renal disease have progressively increased in the last 20 years and, both Hypertension (HT) and Diabetes Mellitus (DM) are the two most important causes of such a condition. Haemodynamic and metabolic perturbations contribute to the development and progression of renal disease and both HT and DM are key factors in the nephropathy. Blood pressure reduction alone is insufficient for maximal renal protection, hence the need for the knowledge of additional mechanisms for nephroprotection in order to establish preventive measures. To contribute to the knowledge of the nephroprotective mechanism of the calcium channel blocking agents (CB) of the dihydropyridine group, this prospective, experimental, longitudinal, and placebo-controlled clinical trial was performed in 55 non-diabetic normotensive and hypertensive adults receiving 3 CB drugs at antihypertensive doses and as monodoses. There were 3 groups. A: Normotensive (n = 25) receiving a single dose of Nitrendipine 20 mg; B: Type I and II hypertensive (n = 15) receiving Nifedipine for 12 weeks; and C: Type I and II hypertensive (n = 15) receiving Amlodipine 5 mg/day, for one week. Together with clinical and hemodynamic responses, biochemical parameters such as renal vasoactive hormones renin, prostaglandins and kallikreins, nitric oxide and cGMP were measured. The antihypertensive effect of CB drugs was confirmed and there was a significant increase in urinary kallikreins excretion related to an increase in nitric oxide. It is concluded that the nephroprotective effect of CB may be due to their capacity to increase urinary kallikreins which in turn, releases nitric oxide production. It is recommended to continue this research with larger number of hypertensive and diabetic patients with nephropathy and longer clinical trials.

Recibido: 06-06-2007. Aceptado: 07-03-2008.

INTRODUCCIÓN

El término de nefroprotección ha sido ampliamente utilizado en los últimos años para definir las diversas medidas preventivas y terapéuticas que tienen como objetivo

mejorar el pronóstico y evitar el deterioro de la función renal, disminuir la necesidad de diálisis o prolongar su llegada, mejorar y optimizar el manejo de pacientes a riesgo de lesión renal. Se ha estudiado y clasificado en enfermedades agudas (IRA) y de pro-

gresión lenta que conlleva a la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) (1). Las primeras, que han sido las menos estudiadas, se han descrito en patologías que comprometen el riego sanguíneo a la nefrona y por ende a su perfusión, la nefrotoxicidad por medios de contraste, antibióticos e inmunosupresores, la rabdomiólisis y crisis de hemólisis masivas, el shock hipovolémico y la IRA perioperatoria (1).

Por su parte, la incidencia de IRC acompañada del correspondiente riesgo de morbi-mortalidad, está aumentando considerablemente en el mundo, y a su lado lo están también la Hipertensión Arterial (HTA) y la Diabetes Mellitus (DM), las dos causas más frecuentes de IRC en el adulto (2). En el desarrollo, progresión y mantenimiento de la nefropatía hipertensiva (NH) influyen factores hemodinámicos múltiples y metabólicos (2) y factores claves en la nefropatía diabética (ND) y no-diabética lo constituyen la HTA tanto sistémica como glomerular a partir del glomérulo, de la matriz mesangial extracelular (3-7) y el daño relacionado con la producción de elementos reactivos de O₂ (7), y el daño túbulo-intersticial (8) que conllevan a la glomeruloesclerosis progresiva (7).

El efecto protector tisular y el nefroprotector en particular de algunas drogas o elementos químicos ha sido bien documentado en los últimos 10 años con múltiples agentes farmacológicos nefroprotectores con diferentes mecanismos de acción y en diversas circunstancias agresoras para el riñón que incluyen: 1) El extracto etílico de la raíz de la *Cassia auriculata* Linn y la teofilina que por sus propiedades antioxidantes y por la liberación de radicales libres protegen al riñón del daño producido por cisplatino y la gentamicina (9, 10). 2) Los diuréticos osmóticos han sido implicados recientemente como nefroprotectores en la necrosis tubular aguda que producen estos compuestos, por su capacidad de proteger

las células epiteliales tubulares (11). 3) Los bloqueadores de los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes (12) o Calcio-antagonistas (CA) lo hacen en la HTA por su capacidad de causar vasodilatación sistémica como consecuencia de la inhibición del flujo lento de iones de Ca²⁺ a través de los canales de tipo L en las membranas celulares (13-18). 4) Las drogas antihipertensivas que bloquean el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) como los Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (IECA) y los bloqueadores de los receptores AT₁ de Angiotensina II son eficaces en la HTA, en la ND o la combinación de HTA + DM, y en la HTA producida por la glomerulonefritis aguda poststreptocócica infantil, por sus propiedades de disminuir la PA, afectar positivamente la hemodinámica glomerular, la inhibición de la producción de Aldosterona y la estimulación de hormonas vasoactivas vasodilatadores renales como son las prostaglandinas y las calicreínas (2, 19, 20). 5) El polisulfato de pentosan ha sido señalado con esta propiedad en la HTA y la hemodinámica glomerular también por sus propiedades antihipertensivas (4). 6) En cambio, en la HTA que se acompaña de fibrosis se han reportado efectos beneficiosos del inhibidor de las vasopeptidasas AVE7688 por sus propiedades antifibróticas y anti-inflamatorias (21-23). 7) Como agente nefroprotector indirecto se ha señalado al nuevo compuesto Belatacept que como inmunosupresor se ha comparado con la Ciclosporina en los casos de trasplante renal y sus efectos nefrotóxicos (24). 8) El efecto beneficioso dual de la aminoguanidina ha sido reportado en Hipertensión pulmonar experimental por inhibir la enzima óxido nítrico-sintetasa inducible (iNOS.2) (25), y en el aumento de productos glicosilados que se acumulan en el lecho vascular en la DM tipo 2, por inhibir la unión cruzada de proteínas en los tejidos vascular y renal mediada por dichos produc-

tos (26). 9) Finalmente, y sin descartar que existan otros, en el modelo experimental de la rata hipertensa por la administración de DOCA + NaCl con cambios estructurales de arterias pequeñas, los compuestos 127722.5 y 135252 ejercen su efecto protector por ser antagonistas de los receptores de las endotelinas vasoconstrictoras (27).

Las acciones sistémicas no-hemodinámicas de las drogas anti-hipertensivas incluyen el efecto beneficioso hemodinámico y no-hemodinámico sobre la circulación y función excretoria renal que han permitido su uso en casos de nefrotoxicidad, en daño renal asociado con el trasplante renal y la HTA severa y también, su efecto estimulador sobre la producción de hormonas vasoactivas (15-17, 28-30) que hacen a su efectividad extenderse más allá de su simple efecto de disminuir la elevada PA en la HTA (14). Sin embargo, pocos reportes se han enfocado intensamente en sus efectos sobre la síntesis y excreción de hormonas vasoactivas renina, calcitriol y prostaglandinas (PG) y el óxido nítrico y el mecanismo de acción celular que pueden contribuir a sus efectos beneficiosos y la nefroprotección.

Desde que Fleckenstein describió la capacidad de las drogas CA para reducir el transporte transmembrana del Ca^{2+} a través de los canales voltaje-dependientes (12) y del reporte inicial de Aoki y col. (31) indicando que la nifedipina (NIF) produce un control efectivo de la presión arterial (PA), se ha acumulado rápidamente evidencia sobre su efectividad y seguridad en el tratamiento de trastornos cardiovasculares incluyendo la HTA (31-36), de manera que el desarrollo de los tejido-selectivos CA ha contribuido a su uso muy difundido como agentes anti-hipertensivos bien conocidos (14, 28). Este marco se ensanchó cuando en 1987 se demostró la formación de ON en el endotelio vascular que abrió una nueva era en la Biología (37-41).

De todos los nefroprotectores demostrados y potenciales mencionados, las drogas antihipertensivas CA y bloqueadores o inhibidores del SRAA han sido lo mayormente estudiados y con mayor efecto demostrado. Por lo antes expuesto, se planteó este estudio para analizar el efecto de las drogas antihipertensivas CA del tipo de las dihidropiridinas sobre las hormonas vasoactivas renales y su posible efecto sobre de la producción de ON, con el fin de contribuir a dilucidar el mecanismo íntimo de la nefroprotección, puesto que el planteamiento no es comparar las drogas antihipertensivas como tales lo cual ya está ampliamente demostrado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo clínico prospectivo, experimental, longitudinal, controlado con placebo en forma aleatoria y comparativo, en el Laboratorio de Investigaciones sobre Hipertensión Arterial de la Cátedra de Farmacología de la Escuela de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia y en la Unidad de Diálisis y Trasplante Renal del Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela, para lo cual se seleccionaron 55 adultos de ambos sexos de 20 a 45 años que dieron su consentimiento escrito para participar en el estudio y con la aprobación del Comité de Ética de la Institución. Los sujetos y los pacientes no ingirieron medicamento alguno desde 3 meses antes del estudio ni donaron sangre en los últimos 6 meses antes de iniciarse el estudio. Aquellos sujetos que presentaran algún trastorno metabólico o causas secundarias de HTA, factores de riesgo tales como obesidad, diabetes, fumador, alcoholismo o la ingestión de píldoras anticonceptivas en las mujeres no fueron admitidos o fueron excluidos del estudio, como también aquellos que presentasen algún efecto indeseable o intolerancia a los medicamentos o no cum-

plieran estrictamente con el esquema del ensayo.

Todos los sujetos estudiados fueron entrenados para coleccionar correctamente una muestra de orina de 24 horas después de lo cual se sometieron a un balance hidro-salino durante 5 días previos al estudio y se mantuvo durante éste. Para mantener esta vigilancia se coleccionaron muestras de orina de 24 horas supervisada mantenida en frío (0 a 5°C), y midiendo el flujo (mL/d) y de una alícuota se midió la concentración urinaria de Na⁺ y K⁺ por fotometría de llama estándar (Clinical Flame Photometer 410C with dilutor 805, Corning, USA) para calcular su excreción urinaria diaria en mEq/d, como U_{Na+V} y U_{K+V} respectivamente. Una vez alcanzado dicho balance, se mantuvieron en el régimen alimentario para alcanzarlo, conteniendo ~140 y ~45 mEq/d de Na⁺ y K⁺ respectivamente hasta terminar el estudio, y agua a voluntad.

Los sujetos y pacientes se dividieron en 3 grupos. Grupo A (Control, n = 25) normotensos y aparentemente sanos a juzgar por el examen clínico completo y de laboratorio pertinentes que se realizaron. Después del periodo de observación, selección y equilibrio hidrosalino, en el día de estudio y después de 8 horas de sueño se midieron peso y talla y se empezó la recolección de orina supervisada, se pusieron en posición de decúbito por 20 min, durante el cual se tomaron muestras de sangre control pre-tratamiento para análisis bioquímicos y hormonal de Actividad Plasmática de Renina (APR) como se detalla más adelante, y se tomó un ECG de reposo. Se midieron a los -30, -15 y 0 min las presiones arteriales (PA) sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM) en mm Hg en reposo y en posiciones sentada y de pie para detectar alguna reacción ortostática, con un sistema computarizado no-canulante (DINAMAP, Critikon Inc, Tampa, Florida, USA). Recibieron entonces a simple ciego a las 08:00 am una

tableta de placebo organolépticamente igual a nitrendipina (NIT) en monodosis y monitoreo por 24 horas, empezando a los 15 min, después cada media hora hasta las 6 horas, continuándose cada hora hasta las 12 horas, y finalmente cada 4 horas hasta completar el estudio a las 24 horas. con recolecciones y mediciones urinarias cada hora, y al final del estudio 24 horas después se tomó otra muestra de sangre para determinación electrolítica, bioquímica y hormonal (APR) y a la semana siguiente recibieron una tableta única de 20 mg de NIT bajo las mismas condiciones y esquema de la fase de placebo.

Los 2 grupos restantes constituidos por hipertensos (n = 30) con HTA primaria de nivel I y II (42), no complicados y sin otra patología asociada, se distribuyeron al azar y se trataron a doble ciego. Grupo B (Experimental₁, n = 15), los cuales previo período con placebo durante una semana y con esquema descrito para el Grupo A, fueron tratados con nifedipina (NIF) 20 mg/día, con régimen de monodosis y monoterapia durante 12 semanas, y Grupo C (Experimental₂, n = 15) que recibieron amlodipina (AML) 5 mg/día con igual régimen al anterior.

En los grupos B y C se establecieron controles semanales. Además del examen clínico, se midieron las PA en la forma ya descrita, y en el grupo C se midieron además con un sistema computarizado de monitoreo de 24 horas (MAPA, Revelation. V.1.52, Hill Med Corporation, Miami, USA). Las muestras de sangre y orina de 24 horas se coleccionaron cada semana.

Tanto los cambios renales y la respuesta clínica como la seguridad y la evolución de los efectos secundarios de las drogas fueron evaluados por la observación clínica, la respuesta hemodinámica, los datos del laboratorio, y por una escala de valores pre-establecida para transformar efectos cualitativos en cuantitativos.

Determinaciones de laboratorio

Los cambios metabólicos inducidos por las drogas se evaluaron a través del análisis de una muestra de orina de 24 horas ya detallada, de la cual después de medido el volumen (cálculo del flujo urinario en mL/24 h), se guardó otra alícuota a -70°C para análisis hormonal. También se tomaron muestras de sangre pre y post-tratamiento en tubos edetizados y enfriados a 0°C , en las cuales una vez separado el plasma por centrifugación en frío (Refrigerated centrifuge Sorvall RT6000, Dupont Instruments Medical Division, Newtown, Connecticut (USA) y mantenidos a -70°C hasta su procesamiento se determinó la actividad de renina plasmática por radioinmunoensayo (APR, ng/mL/h) (43-45), utilizando radioinmunokits marcados con ^{125}I (RENK, Soria Biomedica, Saluggia, Vercelli, Italia) y de óxido nítrico (ON) por la reacción de diazotización (37, 46, 47) que es específica para ON y los óxidos nitrogenados que generan ON bajo soluciones ácidas de HCl 2N y después en una mezcla de HCl 2N + ácido sulfanílico, para finalmente agregarle N-(1-naftil)etilendiamine y medir la absorbancia a 548 nm (Beckman Model 25 Spectrophotometer). La curva de calibración se realizó con nitrito de sodio en agua destilada.

La concentración de PGE_2 urinaria se midió también por radioinmunoensayo (48, 49), pasando por un proceso previo de extracción y purificación (50) con solventes orgánicos en minicolumnas Sep-Pak C_{18} (Waters Associated, Mildford, Mass, USA) de vidrio agregando [^3H - PGE_2] a la orina acidificada con 8,8% de ácido fórmico (51), para luego ser medidas utilizando antisuero para PGs (New England Research Products, Boston, USA) y cuantificadas al mezclarse con líquido de centelleo (Gammafluor, Gamma Nuclear S.A Caracas, Venezuela) y se determinó la radioactividad en un contador (1217 Rackbeta, LKB Wallace, Turku, Finlandia) adaptado a un inscriptor compu-

tarizado (43 Basic KSR Teleprinter, Teletype Corporation, Skokie, Illinois, USA) y se expresó esta última de acuerdo con el flujo urinario, como excreción urinaria ($\text{U}_{\text{PGE}_2\text{V}}$) en ng/día o ng/hora).

La actividad de las caliceínas urinarias se determinó colorimétricamente (52, 53) utilizando un substrato tripéptido sintético cromogénico (S-2266, Kabi Diagnostic, Estocolmo, Suecia), que una vez obtenida esta actividad en unidades esterásicas (UE) se expresarán como excreción urinaria (U_{CalicV}) en U/día o mU/día de acuerdo con el flujo urinario. Para comprobar la cantidad de caliceínas inactivas en las muestras, se trataron con tripsina (49).

Análisis estadístico

Todos los sujetos sirvieron como sus propios controles. Los resultados obtenidos se analizaron con sistema estadístico GraphPad InStat versión 3 y GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software Inc. San Diego, California, USA, 2005). y se expresaron como sus valores absolutos, porcentajes y como media \pm desviación Estándar ($M \pm DE$). Las diferencias entre el efecto entre las drogas y el placebo se evaluaron por el test de Student pareado, el test de ANOVA de una vía, y se tomó 95% de grados de confianza ($p < 0, 05$) como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Los sujetos controles y los pacientes no presentaron eventos de morbilidad durante el estudio. Los 3 medicamentos fueron bien tolerados, y los efectos secundarios encontrados fueron los ya conocidos inherentes a las dihidropiridinas; tampoco hubo alteraciones en las funciones orgánicas de los pacientes, corroborados por la normalidad de las pruebas de laboratorio, y no hubo abandono del estudio por razones inherentes a éste.

La Tabla I muestra las características de los pacientes distribuidos por grupos de estudio, antes del comienzo de la administración de los medicamentos estudiados.

La Fig. 1 muestra los resultados de la primera etapa del estudio, realizada en sujetos normotensos y aparentemente normales (Grupo A) para establecer los parámetros y las tendencias funcionales y hormonales controles sin tratamiento alguno primero y después bajo el efecto de la NIT monitorizados durante 24 horas. Hubo un descenso leve no significativo de la PA, que coincidió con el máximo incremento en los 3 sistemas hormonales renales, que se mantuvo hasta el final a las 24 horas.

La Fig. 2 muestra el efecto estimulador de la NIF sobre las hormonas vasoacti-

vas renales en pacientes hipertensos. Se observó el conocido efecto antihipertensivo de la droga mantenido durante los 3 meses de terapia y coincidiendo con este efecto hormonal.

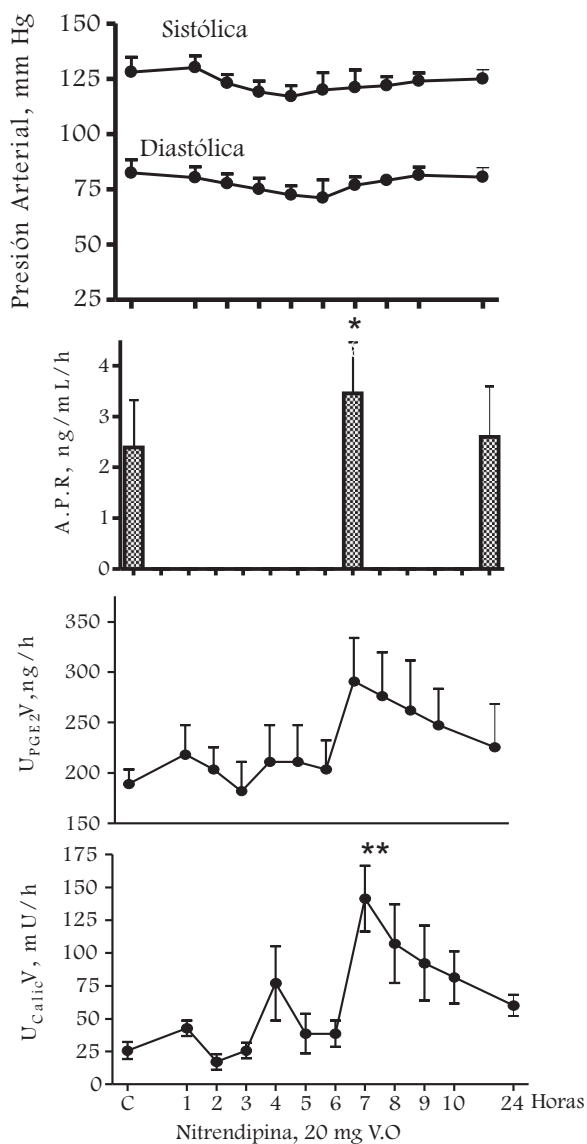
Así mismo, la Fig. 3 muestra el efecto antihipertensivo de AML tomado a los 15 pacientes hipertensos tratados al medir las PAS y PAD con sistema monitorizado de 24 horas al comienzo del régimen terapéutico, a manera de control y para establecer su patrón de acción durante el ritmo circadiano de la PA.

La Fig. 4 muestra los efectos hemodinámicos y hormonal (ON) y sobre el cGMP producidos por la administración de AML a largo plazo (3 meses), y la Fig. 5 muestra claramente la relación significativa de de-

TABLA I
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

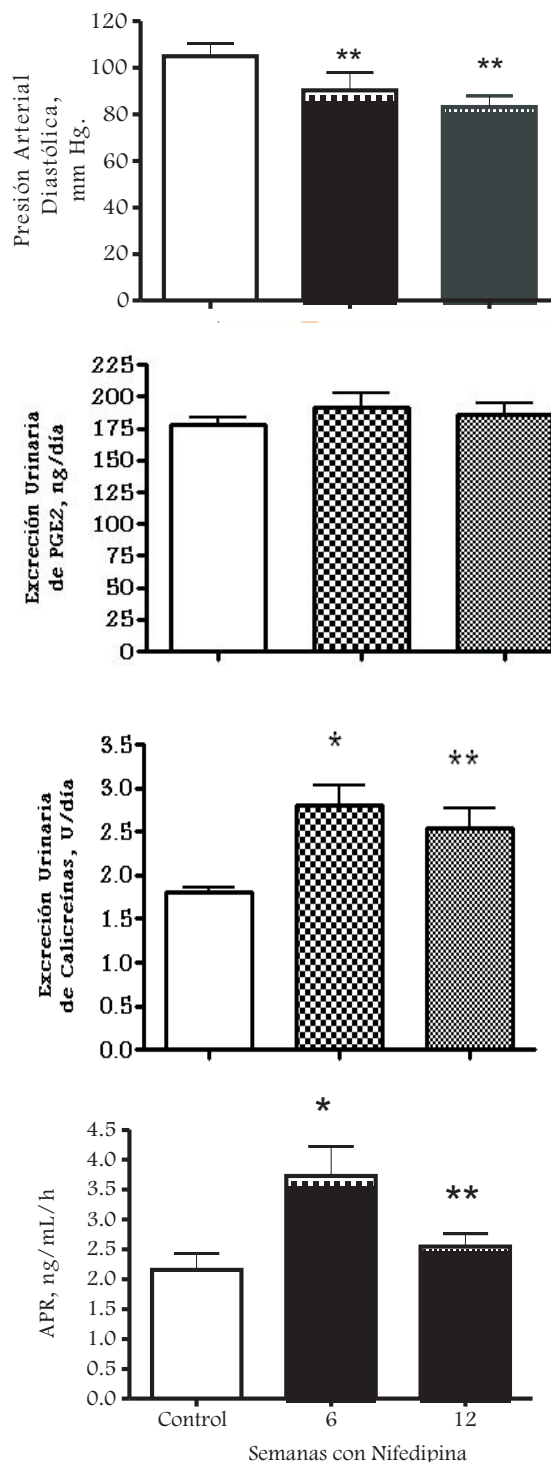
	Grupo A Normotensos	Grupo B Hipertensos + NIF	Grupo C Hipertensos + AML
Tiempo con HTA (años)		2,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3
Edad (años)	36,3 ± 7,8	36,72 ± 9,5	39,75 ± 4,9
Sexo (♀/♂)	4/11	9/6	10/5
Peso (kg)	82,11 ± 6,23	79,12 ± 8,7	78,91 ± 8,9
PAS (mm Hg)	132,7 ± 0,8	156,8 ± 1,9	164,8 ± 0,8
PAD (mm Hg)	78,5 ± 8,4	104,8 ± 5,6	104,1 ± 1,4
FC (lat/min)	88,7 ± 5,6	79,5 ± 3,4	84,9 ± 1,0
Glicemia basal (mg/dL)	98,3 ± 6,7	101,3 ± 9,3	89,4 ± 8,7
Flujo urinario (mL/día)	1,056 ± 28,7	980,9 ± 34,7	1.340,6 ± 78,8
Depuración de Creatinina Endógena (mL/min/1.73 m ²)	118,6 ± 6,8	101,2 ± 7,8	105,8 ± 5,7
A.P.R (ng/mL/h)	2,094 ± 0,92	2,33 ± 1,19	1,88 ± 0,96
Caliceínas urinarias (U/día)	2,79 ± 09	1,94 ± 0,82	1,70 ± 1,15
PGE2 urinarias (ng/día)	144,57 ± 72,89	166,52 ± 88,33	186,0 ± 116,7
Óxido nítrico sérico (nM/mL)	26,76 ± 7,6	22,46 ± 1,68	25,47 ± 1,47
cGMP urinario (mmMl/d)	1,58 ± 0,27	1,52 ± 0,32	1,45 ± 0,43

Los valores se tomaron en todos los casos antes de iniciar cualquier medicamento, y en condiciones basales. PAS y PAD = Presiones Arteriales Sistólica y Diastólica respectivamente. FC = Frecuencia Cardíaca. A.P.R = Actividad Plasmática de Renina.



C = Periodo Control, pre-tratamiento; U_{CalicV} = Excreción urinaria de Calicreínas; U_{PGE_2V} = Excreción urinaria de Prostaglandinas E₂; A.P.R = Actividad de Renina plasmática; * = p < 0,05; ** = p < 0,01

Fig. 1. Efectos de la Nitrendipina oral sobre la producción hormonal renal en los sujetos normales/normotensos, y analizada en un periodo de 24 horas (ver también Fig. 2 y 5).



Para la leyenda de los ejes Y, véase la Fig. 1; * = p < 0.05; ** = p < 0.02

Fig. 2. Liberación hormonal producida por la administración de Nifedipina después de 3 meses de tratamiento.

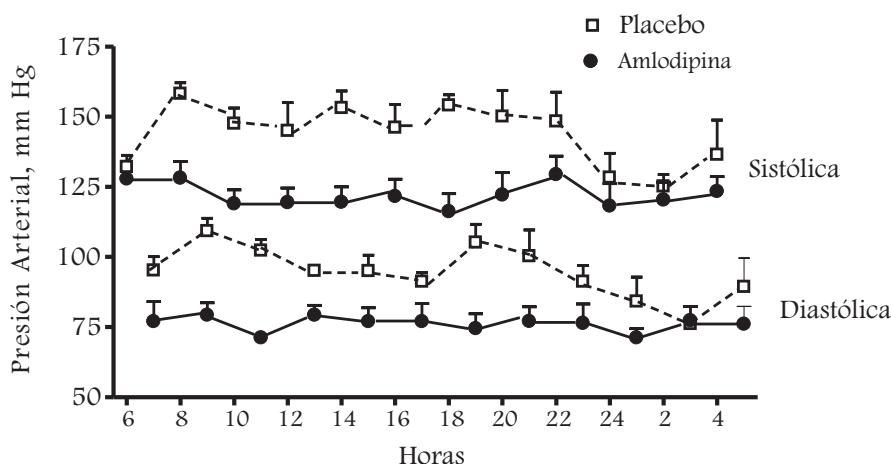


Fig. 3. Registro típico de las PAS y PAD durante 24 horas en el tratamiento con Amlodipina en los pacientes hipertensos. Se observa y confirma el efecto de esta droga sobre el descenso de la PA durante las horas de sueño profundo, que no lo modificó. El esquema horario se expresa en base a 24 horas, comenzando al amanecer (6:00 am).

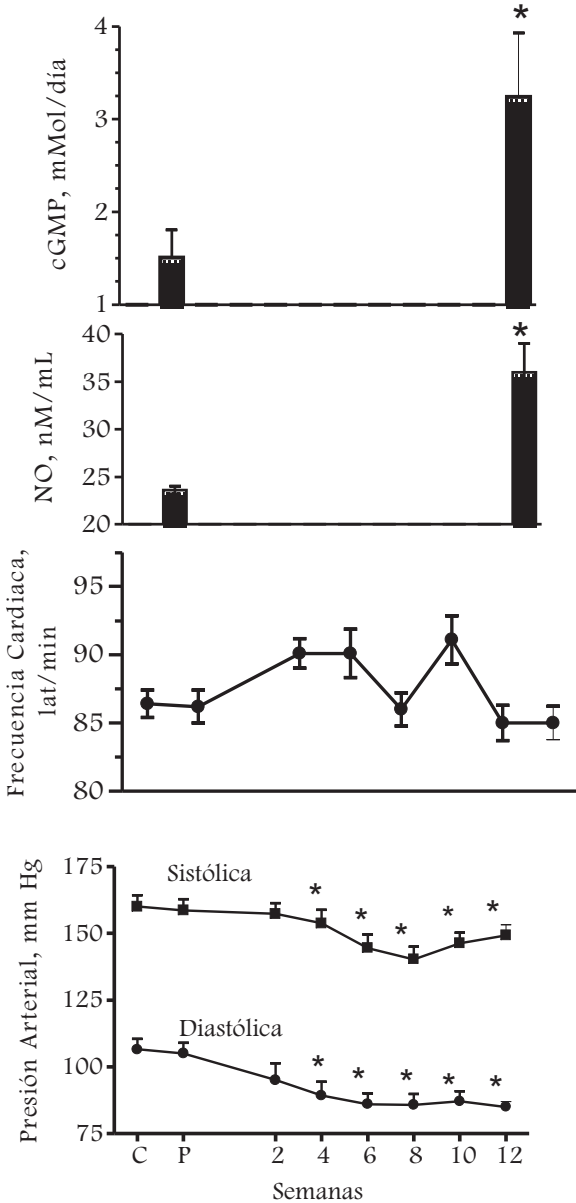
pendencia de la liberación de ON a medida que se estimularon las calicreínas urinarias bajo el efecto de la AML. Finalmente, la Fig. 5 señala claramente la correlación altamente significativa entre la estimulación de la calicreínas urinarias y la producción de ON en términos de porcentaje de estimulación de ambos.

DISCUSIÓN

Preservar la función renal en adultos con HTA y DM es un motivo de consenso universal (54), de manera que el propósito final de la terapia es el control de las altas cifras de PA combinado con una protección maximizada de los órganos blanco susceptibles de daño. Parece ser una tendencia actual que cuando la PA puede controlarse en pacientes hipertensos sin nefropatía, el tipo de droga de inicio puede no tener relevancia (55); y en estos casos los CA son efectivos y bien tolerados y deben ser considerados como drogas de primera línea antihipertensiva, mientras que los bloqueadores del SRAA serían los indicados al haber nefropatía (55), considerándose así el término "nefroprotección", y así se han descrito dos formas básicas de terapia antihipertensiva

nefroprotectora ya citadas. La nefroprotección se puede llevar a cabo por dos vías: la preventiva que es la ideal, para evitar el daño renal, y la curativa. La primera que resulta la más difícil de cumplir, se lleva a cabo aplicando medidas no-farmacológicas conocidas para tratar los factores de riesgo de la DM y la HTA, y las farmacológicas utilizando los medicamentos adecuados con los criterios de dosis y frecuencia también adecuados, para mantener niveles óptimos de PA recomendados (42) para ambas patologías. La curativa es un término relativo puesto que el daño renal es irreversible una vez instalado, pero si es factible detenerlo y prolongar la calidad de vida del paciente. Las dos vías son aplicables, y es el reto que tenemos que afrontar en el futuro cercano.

La abundante literatura sobre el fenómeno de la nefroprotección en humanos y modelos experimentales en ratas se refiere a 3 tipos de nefropatía: la ND (2, 3, 6, 7, 13, 21, 23), la NH (1, 2, 5, 7, 14, 17, 18, 54, 56-59) y las glomerulopatías membranoproliferativas albuminúricas de origen inmunológico (19, 20, 38, 60-62) que tienen mecanismos fisiopatológicos diferentes (59) cuyo conocimiento ha dado origen a múltiples formas de terapia farmacológica y



C = Periodo control, pre-tratamiento; P = Periodo Placebo por una semana; * = $p < 0,05$

Fig. 4. Efecto de la Amlodipina sobre la producción de Óxido Nítrico, y su precursor el cGMP en los pacientes hipertensos I y II después de 3 meses de tratamiento.

formas de nefroprotección. Sin embargo, el efecto renoprotector de estos dos tipos de drogas no está exento de controversias y discusiones. Adicionalmente, reciente revisión de estudios clínicos randomizados,

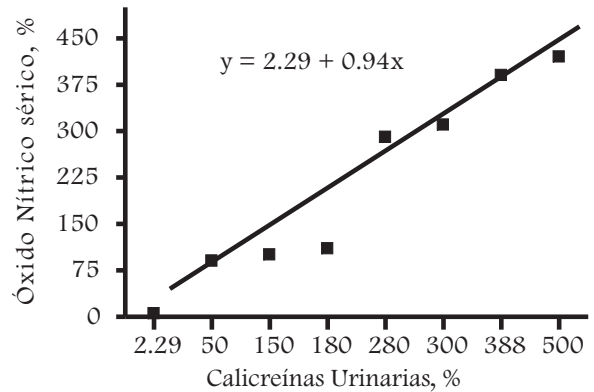


Fig. 5. Relación entre la liberación de Caliceínas urinarias y la concentración de ON en los pacientes tratados con Amlodipina por 12 semanas. El efecto se refiere al aumento porcentual de ambos elementos, comparados con los valores pre-tratamiento; $r = 0,082$, $p < 0,01$

prospectivos, a largo plazo y con gran número de pacientes, basados en evidencia indican que más del 65% de los hipertensos diabéticos requieren dos o mas medicamentos antihipertensivos diferentes para lograr el objetivo sugerido de 130/80 mm Hg para preservar la función renal y reducir los eventos cerebro-vasculares (42, 54, 55, 61).

En este estudio se hizo una búsqueda tanto bibliográfica como experimental para la explicación del mecanismo renoprotector de los dos tipos de drogas antihipertensivas más utilizadas en la práctica médica. Estos resultados concuerdan con la mayoría de lo publicado al respecto y refuerza esos resultados. Se utilizaron los CA en un estudio a corto y mediano plazo en pacientes hipertensos sin nefropatía ni diabéticos con la intención de identificar el (los) mecanismo (s) nefroprotector que resulte de la disminución y control de la PA, ya que para analizar el efecto nefroprotector clínico se necesitan estudios a muy largo plazo y alto número de pacientes, que no fue el propósito de este estudio, que constituye una primera etapa en esta línea de ensayos.

El desarrollo y progresión de la enfermedad renal está altamente influenciado por las perturbaciones hemodinámicas y metabólicas, y la HTA tanto sistémica como intraglomerular y la DM son factores claves en la ND y no-diabética (2). En condiciones normales, existe un mecanismo autorregulatorio que protege a la microcirculación renal de los efectos de la elevada PA, y cuando este mecanismo se trastorna produciéndose alteraciones hemodinámicas y metabólicas contribuyen al desarrollo y progresión de la nefropatía, como sucede en la DM y en la HTA, y se producen la ND o NH. El factor clave para ambas es la hipertensión tanto sistémica como intraglomerular (8); la ausencia continua del mecanismo autorregulatorio exacerba los efectos producidos por la elevada presión que lleva a la glomerulopatía y a medida que progresa, el efecto de la hipertensión sistémica sobre la presión intraglomerular y el flujo sanguíneo renal contribuyen al desarrollo de proteinuria e IRC progresiva (2).

No obstante, la reducción de la PA por sí sola es insuficiente para la máxima u óptima protección renal. Datos disponibles indican que además de su comprobada eficacia antihipertensiva, los inhibidores y antagonistas del SRAA son efectivos en prevenir o retardar la progresión de la microalbuminuria, inhibiendo así la progresión hacia la nefropatía y por consiguiente, hacia la IRC en pacientes con daño renal. Estos beneficios renoprotectores se han observado en pacientes diabéticos y no-diabéticos, en hipertensos y en normotensos; pero por otra parte, es aparente que este tratamiento sugerido para las nefropatías crónicas albuminúricas con la administración de IECA + inhibidores de AT1 disminuye pero no detiene la progresión del proceso, y no son efectivas en el mismo grado en todos los pacientes (61), que sólo puede revertirse con combinaciones de IECA + estatinas + bloqueadores de los receptores de Ang. II (61). Ade-

más, a pesar del amplio soporte reportado de que los IECA son agentes terapéuticos poderosos (2, 3, 20, 62), se ha sugerido que ellos no sean renoprotectores uniformemente en pacientes con nefropatía membranosa proteinúrica (60), y que este papel renoprotector se debe únicamente a la inhibición de Angiotensina II en modelos de nefropatía membranosa (62), pero también es cierta la demostración de la estimulación de las caliceínas y PGs en la glomerulopatía de origen inmunológico en humanos (20). Evidencia acumulada indica que debe existir otro mecanismo en la acción de las drogas antihipertensivas consistente en prevenir o retardar la progresión de la microalbuminuria e inhibiendo así la progresión hacia la IRC (2, 3, 13, 19, 20, 59, 64-70), de allí que el estudio de los efectos de las drogas anti-hipertensivas en el riñón es particularmente importante por sus dos efectos beneficiosos, disminuir la PA y la protección tisular óptima, y por eso la contribución al conocimiento de estos mecanismos nefroprotectores se hace necesario para poder desarrollar nuevas vías nefroprotectoras en el futuro.

Por su parte, los CA tienen acciones importantes y participación en estos procesos. Son ampliamente usados como antihipertensivos (7, 12, 13, 17, 18, 29, 31, 35, 36, 41, 55, 58, 68, 69, 71) por su efectiva potencia en reducir la PA y la relativa buena tolerancia. Sin embargo, estudios en animales que analizan la progresión de la enfermedad renal dan resultados conflictivos, y parece que el efecto nefroprotector de los CA depende de la naturaleza del proceso patológico, los tipos de drogas y las dosis utilizadas (59), y que su efecto nefroprotector puede deberse a otros efectos además del antihipertensivo como ya se ha comentado.

La benidipina, un CA de larga duración, ha mostrado efectos nefroprotectores no sólo en modelos de NH como rata Dahl sensible a sodio (72), y ratas espontáneamente

hipertensas uninefrectomizadas (73), sino también en ratas con síndrome nefrótico inducido por puromicina (74) y diabéticas (57), y también se ha reportado que la reducción en la PA en ratas hipertensas tratadas con un CA se acompañó de una mejoría de la función endotelial y la prevención de la infiltración de macrófagos monocitos en el subendotelio aórtico (56).

El influjo de Ca^{2+} extracelular a las células es importante en la acción no sólo de la Ang II y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) en la proliferación celular (71), sino también del factor de transformación del crecimiento o TGF- β en la producción de colágeno (59) y que participa también en la progresión de la glomerulosclerosis. En concordancia con esto, otro elemento que se agrega es el sistema caliceínas-cininas que están presentes tanto en el tejido renal como en el tejido vascular, y las cininas endoteliales estimulan producción de mediadores endoteliales que incluyen el ON y las prostaglandinas (65), y así mismo, un sistema caliceínas-cininas en la microcirculación tiene una función importante en el control de la producción de ON (65, 69, 71).

En la nefropatía diabética experimental, parece que se produce un trastorno fisiopatológico consistente en una disminución de la activación de las caliceínas renales, y se ha sugerido que los CA son nefroprotectores que lo hacen porque atenúan este descenso de las caliceínas activas que no hicieron los IECA (Captopril), de manera que hay nefroprotección porque hubo disminución de la inhibición de caliceínas (aumento indirecto de ellas) en ratas diabéticas, con benidipina (57).

La secuencia de administración de 3 drogas antihipertensivas CA en este estudio a dosis conocidas como antihipertensivas, produjo resultados que refuerzan la noción de que ellos están involucrados en nefroprotección adicional a la disminución y control

de la PA. Basados en sus características farmacodinámicas, se hicieron mediciones de la PA ambulatoria (MAPA, Fig. 3) bajo el efecto de AML que no modificó el ritmo circadiano del sueño al compararlo con el placebo, se observa bien que el efecto antihipertensivo y por ende, renoprotector se mantiene durante todo el día con una monodosis matutina de lo cual se puede extrapolar un efecto similar en el tratamiento a largo plazo con NIF y AML (Figs. 2, 4). La administración de NIT a sujetos normotensos no-diabéticos con función renal normal produjo incrementos significativos de las caliceínas urinarias pero no de PGs (Fig. 1, 2), en los cuales se puede deducir que este efecto se debió sólo a la droga y no por algún trastorno del tejido renal, y así mismo estos efectos se reprodujeron al administrar NIF y AML en hipertensos tipo I y II sin diabetes ni nefropatía (Figs. 2 y 4), sugiriendo que estos 3 tipos de CA tienen como efecto significativo común la estimulación de la producción renal de caliceínas relacionado con los efectos hemodinámicos (Figs. 1, 2 y 4) y aunque no significativas, de las PGs también. Estos hallazgos están reforzados con el incremento simultáneo de la APR que es un indicativo de actividad vasodilatadora (Figs. 1, 2), de manera que el efecto inmediato y tardío está más orientado hacia las caliceínas para estimular a su vez al sistema del ON, las Figs. 1 y 2 sugieren esta afirmación. Adicionalmente, al correlacionar ambas excreciones con la producción de ON cuando se administró AML, se obtuvo una correlación significativa sugestiva de tal dependencia (Fig. 5) (68, 69, 71). De manera que en este estudio, es aparente que el factor significativo es la excreción de caliceínas renales relacionados con los efectos observados, que pudiera indicar que las caliceínas (o el sistema caliceínas-cininas) puede jugar un papel importante en este complejo evento, siendo los factores que liberan ON, que es el elemento vasodi-

latador terminal en esta cadena de eventos. También se ha profundizado el conocimiento de los mecanismos de acción de los CA al reportarse que influyen la neurotransmisión (75) que tendría aplicabilidad en el futuro cercano.

Como relajantes vasculares, tanto los nitratos orgánicos tales como la nitroglicerina y el dinitrato de isosorbide, y los nitrocomplejos inorgánicos como el nitroprusiato de sodio han sido utilizados en clínica muchos años antes de que se conociera su mecanismo de acción, y éstos nitrovasodiladores tienen en común la capacidad de servir de donantes de ON dadas las propias condiciones metabólicas o de redox (39). ON estimula la enzima guanilil-ciclasa produciendo un aumento en el cGMP en el músculo liso vascular; las cinasas de proteínas que resultan de esta estimulación pueden ser las responsables de la relajación del músculo liso vascular (76) (Fig. 4), de manera que la cuantificación de este nucleótido cíclico es una señal directa de la estimulación de ON también (Fig. 4), y este sería el mecanismo propuesto de los CA como estimuladores de calicreínas y éstas de ON, lo cual también es reforzado por el reporte de que tanto Ramipril (IECA) como Nifedipina aumentan los niveles de ON en los vasos coronarios (65, 66).

Si bien es cierto que algunos estudios han demostrado que el tratamiento dirigido a incrementar la biodisponibilidad de ON es nefroprotector (8, 63, 77, 78), también lo es el hecho sugerido de que ON puede ser citotóxico porque facilita la producción de peroxinitrito en la interacción del ON con el superóxido (60), lo cual pudiera ser una limitante para el beneficio potencial en el tratamiento de la enfermedad renal (8, 64).

La ET1 está aumentada en normotensos descendientes de hipertensos (79) y se señaló que los efectos biológicos y la producción de ET-1 en el riñón son contrarres-

tados por ON (60), y de allí una importancia adicional de esta producción.

AGRADECIMIENTO

El estudio fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia (CONDES), proyecto 1731-94.

A Bayer de Venezuela S.A. y Pfizer de Venezuela S.A. por proveer los medicamentos utilizados y sus respectivos Placebos.

A Jesús Aníbal Bermúdez, de la Unidad de Diálisis y Transplante Renal del Hospital Universitario de Maracaibo, y Lic. Edióver Ch. González de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de LUZ por su eficiente asistencia técnica en el procesamiento de las muestras.

A los Drs. Francisco Puentes-Arciniegas y Paúl Y. Casanova-Romero, por su colaboración durante todas las etapas del Proyecto.

A la Lic. Lysbeth Nava de Guanipa, por su eficiente contribución en el manejo dietético de los pacientes.

REFERENCIAS

1. **Malaver-Jiménez N.** Nefroprotección en el paciente agudamente enfermo. Publicaciones de la Universidad Javeriana: Nefroprotección. Bogotá, Colombia 2003.1-9.-En línea: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43nl/0003>.
2. **Karalliedde J, Viberti G.** Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin system in hypertension and diabetes. *J Human Hypertens* 2006; 20:239-253.
3. **Schmieder RE.** Nephroprotection by antihypertensive agents. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24 Suppl 2:s55-s64.
4. **Bobadilla NA, Tack I, Tapia E, Sánchez-Lozada LG, Santamaría J, Jiménez F, Striker LJ, Striker GE, Herrera-Acosta J.** Pentosan polysulfate prevents glomerular hypertension and structural injury despite

- persisting hypertension in 5/6 nephrectomy rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2080-2087.
5. **Gluhovschi G, Buzdóg G, Petrica L, Schiller A, Trandafirescu V, Vilcoiv S, Glubovschi C, Bob F.** Multi-organ protection and the kidney. From nephroprotection, cardioprotection, neuroprotection to multi-organ protection. *Nefrología* 2004; 24:519-530.
 6. **Abbot K, Basta E, Bakris GL.** Blood pressure control and nephroprotection in diabetes. *J Clin Pharmacol* 2004; 44:431-438.
 7. **Ungar A, Di Serio C, Lambertucci L, Monami M, Masotti G.** Calcium channel blockers and nephroprotection. *Aging Clin Exp Res* 2005; 17:31-39.
 8. **Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J.** Tubulointerstitial damage and progression of renal failure. *Kidney Int* 2005; 68(Suppl 99):s82-s86.
 9. **Annie S, Rajagopal PL, Malini S.** Effect of *Cassia auriculata* Linn. root extract on cisplatin and gentamicin-induced renal injury. *Phytomedicine* 2005; 12:555-560.
 10. **Benoehr P, Krueth P.** Nephroprotection by theophylline in patients with cisplatin chemotherapy: a randomized, single-blinded, placebo-controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:452-458.
 11. **Pingle SC, Mishra S, Maruzzi A, Bhat SG, Sekino Y, Rybak LP, Ramkumar V.** Osmotic diuretics induce adenosine A₁ receptor expression and protect renal proximal tubular epithelial cells against Cisplatin-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279:41:43157-43167.
 12. **Fleckenstein A.** Calcium antagonists in heart and smooth muscle. Experimental facts and therapeutic prospects. New York (USA): John Wiley & Sons Publishers. 1983, pp 1-399.
 13. **Segura J, García-Donaire J, Ruilope LM.** Calcium channel blockers and renal protection: insights from the latest clinical trials. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:64- 66.
 14. **Nayler WG, Britnell S.** Calcium antagonists and tissue protection. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18(Suppl 1):s1-s5.
 15. **Abe Y, Komori T, Miura K.** Effects of the calcium antagonist nicardipine on renal function and renin release in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:254-259.
 16. **Yokoyama S, Kaburagi T.** Clinical effects of intravenous nifedipine on renal function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:67-71.
 17. **Colina-Chourio JA, Godoy N, Oliveros-Palacios M, Arocha I.** Long-term (3 years) sustained antihypertensive and metabolic actions of nitrendipine in severe, complicated, and resistant hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; 18(Suppl 1): s84-s90.
 18. **Godoy-Godoy N, Oliveros MCh, Colina-Chourio J.** Efectividad de la nifedipina (tableta 20 mg, liberación retardada) en el manejo de la hipertensión arterial severa y refractaria. *Arch Venez Farmacol Terap* 1987; 6:192-198.
 19. **Redon J.** Renal protection by antihypertensive drugs: insights from microalbuminuria studies. *J Hypertens* 1998; 16(Suppl):2091-2100.
 20. **Parra G, Rodríguez-Iturbe B, Colina-Chourio J, García R.** Short-term treatment with captopril in hypertension due to acute glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1988; 29:58-62.
 21. **Schaffer S, Linz W, Vollert H, Biemer-Daub G, Rutten H, Bleich M, Busch AE.** The vaso-peptidase inhibitor AVE7688 ameliorates Type 2 diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2004; 47:98-103.
 22. **Gross O, Koepke ML, Beirowski B, Schulze-Lohoff, Segerer S, Weber M.** Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vaso-peptidase inhibitor AVE 7688. *Kidney Int* 2005; 68: 456-463.
 23. **Schafer S, Schmidts HL, Bleich M, Busch AE, Linz W.** Nephroprotection in Zucker diabetic fatty rats by vaso-peptidase inhibition is partly bradykinin B₂ receptor dependent. *Br J Pharmacol* 2004; 143:27-32.
 24. **Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerie T, Nashan B, Blancho G, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K,**

- Carpernter B.** Belatacep Study group. *N Eng J Med* 2005; 353:770-781.
25. **Wideman RF, Bowen OT, Erf GF, Chapman ME.** Influence of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on the pulmonary hypertensive response to microparticle injections in broilers. *Poult Sci* 2006; 85:511-527.
26. **Freedman BI, Wuerth JP, Cartwright K, Bain RP, Dippe S, Hershon K, Mooradian AD, Spinowitz BS.** Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic nephropathy (ACTION III). *Control Clin Trials* 1999; 20:493-510.
27. **Li JS, Turgeon A, Schiffrin EL.** Effect of chronic treatment with two different ET (A) selective endothelial receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11:554-562.
28. **Epstein M.** Calcium antagonists and the kidney. Implications for renal protection. *Am J Hypertens* 1991; 4:482s-486s.
29. **Leonetti G, Cuspidi C, Sampieri L, Tergoli L, Zanchetti A.** Comparison of cardiovascular, renal and humoral effects of acute administration of two calcium channel blockers in normotensive and hypertensive subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4:s319-s324.
30. **Lahera V, Ruilope LM, Romero JC.** A single mechanism to explain the effects of calcium on renal function. *Am J Hypertens* 1991; 4:473s-481s.
31. **Aoki K, Kondo S, Mochizuki A, Yoshida T, Kato S, Kato K, Takikawa K.** Antihypertensive effects of cardiovascular Ca^{2+} -antagonist in hypertensive patients in the absence and presence of beta-adrenergic blockade. *Am Heart J* 1978; 96:218-226.
32. **Opie LH (ed):** Clinical use of calcium channel antagonists drugs. Boston (USA): Kluwer Academic Press. 1990.
33. **Stone D.** The effect of nifedipine on coronary haemodynamics and exercise left ventricular function. *Postgrad Med* 1983; 5(Suppl 2):35-38.
34. **Serruys PW, Hooghdt TE, Slager C, Brower RW, Hugenholtz PG.** Influence of intracoronary nifedipine on left ventricular function, coronary vasomotility and myocardial oxygen consumption. *Br Heart J* 1983; 49:427-441.
35. **Kazda S, Gardoff B, Knorr A.** Nitrendipine and other calcium entry blockers in hypertension. *Fed Proc* 1983; 42:196-200.
36. **Oparil S, Calhoun DA.** The calcium antagonists in the 1990s. *Am J Hypertens* 1991; 4:396s-405s.
37. **Ignarro OJ, Buga GM, Wood KS, Byns RE, Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84:9265-9269.
38. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Biosynthesis of nitric-oxide from L-Arginine: a pathway for the regulation of cell function and communications. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:1709-1715
39. **McDonald LJ, Murad F.** Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211:1-6.
40. **Murad F.** Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 1999; 19:133-154.
41. **Mason RP, Marche P, Hintze TH.** Novel vascular biology of third-generation L-Type calcium channel antagonists. Ancillary actions of Amlodipine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:2155-2163.
42. **Joint Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-7):** The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Int Med* 2003; 289(19):2560-2572.
43. **Rodríguez-Iturbe B, Baggio B, Colina-Chourio J, Favaro S, García R, Sussana F, Castillo L, Borsatti A.** Studies on the renin-aldosterone system in the acute nephritic syndrome. *Kidney Int* 1981; 19: 445-453.
44. **Haber E, Koerner LT, Page LB, Kliman B, Purnode A.** Application of Radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma rennin activity in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1969; 29:1349-1355.

45. **Todesco S, Terribile V, Borsatti A, Mantero F.** Primary aldosteronism due to malignant ovarian tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 41:809-812.
46. **Archer S.** Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7:349-360.
47. **Moshage H, Kok B, Huizanga JR, Jansen PLM.** Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41:892-896.
48. **Zusman RM, Caldwell BV, Speroff L, Behrman HR.** Radioimmunoassay of the A Prostaglandins. *Prostaglandins* 1972; 2: 41-53.
49. **Arbeit LA, Serra SR.** Decreased total and active urinary kallikrein in normotensive Dahl salt susceptible rats. *Kidney Int* 1985; 28:440-446.
50. **Nasjletti A, McGiff J, Colina-Chourio J.** Interrelations of the renal kallikrein-kinin system and renal prostaglandins in the conscious rat. Influence of mineralocorticoids. *Circ Res* 1978; 43:799-807.
51. **Colina-Chourio J, McGiff JC, Nasjletti A.** Effect of indometacin on blood pressure in the normotensive unanesthetized rabbit: Possible relation to prostaglandin synthesis inhibition. *Clin Sci* 1979; 57:359-365.
52. **Amundsen E, Putter J, Friberger P, Knos M, Larsbratten M, Claeson G.** Methods for the determination of glandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptide substrate. In: Fuji S, Moriya H, Suzuki T, eds. *Advances in Experimental Biology and Medicine. Kinins II: Biochemistry, Pathophysiology and Clinical aspects.* New York (USA): Plenum Publishing. 1978: 83-85.
53. **Bonner G, Marín-Grez M.** Measurement of kallikrein activity in urine of rats and man using a chromogenic tripeptide substrate. Validation of the amidolytic assay by means of a bradykinin radioimmunoassay. *J Clin Chem Biochem* 1981; 19:165-168.
54. **Bakris GL, Williams M, Dworkin K, Elliott WJ, Epstein M, Toto R, Tuttle K, Douglas J, Hsueh W, Sowers J.** Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group. *Am J Kidney Dis* 2000; 36:646-661.
55. **Tobe S.** Update on calcium antagonists and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12:309-315.
56. **Gray GA, Clozel M, Clozel JP, Baumgartner HR.** Effects of calcium channel blockade on the aortic intima in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 22:569-576.
57. **Yoshida K, Kohzuki M, Yasujima M, Kanazawa M, Abe K.** Effects of benidipine, a calcium antagonist, on urinary kallikrein excretion and renal impairment in experimental diabetes. *J Hypertens* 1996; 14: 215-222.
58. **Hernández-Hernández R, Armas-Hernández MJ, Colina-Chourio JA, Armas-Padilla MC, López L, Álvarez M, Pacheco B.** Comparative effects of amlodipine and nifedipine GITS during treatment and after missing two doses. *Blood Press Monit* 2001; 6:47-57.
59. **Nakamura T, Obata J, Onitsuka M, Shimada Y, Yoshida Y, Kawachi H, Shimizu F.** Benidipine, a long-acting calcium-channel blocker, prevents the progression to end-stage renal failure in a rat mesangioproliferative glomerulonephritis. *Nephron* 2000; 86:315-326.
60. **Rodríguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ.** Oxidative stress, renal infiltration of immune cells and salt-sensitive hypertension: All for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; F606-F616.
61. **Zoja C, Corna D, Camozzi D, Carraneo D, Rottoll D, Batani C, Zanchi C, Abbate M, Remuzzi G.** How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:3024-3026.
62. **Zoja C, Donadelli R, Corna D, Testa D, Facchinetti D, Maffi R, Luzzana E, Colosio V, Bertani T, Remuzzi G.** The renoprotective properties of angiotensin-converting enzyme inhibitors in a chronic model of membranous nephropathy are solely due to inhibition of angiotensin II:

- evidence based on comparative studies with a receptor antagonist. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:254-264.
63. **Ashab I, Peer G, Blum M, Wollman Y, Chemihovsky T, Hassner A, Schwartz D, Cabili S, Silverberg D, Iaina A.** Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production. *Kidney Int* 1995; 47: 1515-1521.
64. **Rangan GK, Wang Y, Harris DC.** Pharmacologic modulation of nitric oxide exacerbate tubulointerstitial inflammation in proteinuric rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1696-1705.
65. **Zhang X, Scicli GA, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH.** Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension* 1997; 30:1105-1111.
66. **Asanuma H, Kitakaze M, Funaya H, Takashima S, Minamino T, Node K, Sakata Y, Asakura M, Sanada S, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Tada M, Hori M.** Nifedipine limits infarct size via NO-dependent mechanisms in dogs. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:497-505.
67. **Liu X, Lukasova M, Zubalova R, Lewicka S, Hilgenfeldt U.** A kallidin-like peptide is a protective cardiac kinin, released by ischaemic preconditioning of rat heart. *Br J Pharmacol* 2005; 146:952-957.
68. **Ávila-Hernández R, Puentes-Arciniegas F, Casanova-Romero PY, Godoy-Godoy N, Urdaneta-Jaimes JA, Colina-Chourio JA.** Relación del efecto antihipertensivo de Amlodipina con las Calicreínas Urinarias. *Rev Acad Med Zulia* 1997; 30:83-91.
69. **Zhang X, Hintze TH.** Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation* 1998; 97:576-580.
70. **Shultz PJ, Rajj L.** Effect of amlodipine on mesangial cell proliferation and protein synthesis. *Am J Hypertens* 1992;5: 912-914.
71. **Casanova-Romero PY, Ferrer-Córdova JC, Colina-Chourio JA, Casanova-Romero I, Molero M, Puentes-Arciniegas F, Ávila-Hernández R, Godoy-Godoy N, Colina-Araujo JA.** Relación del óxido nítrico con el antecedente genético de hipertensión arterial, y su respuesta a la Amlodipina. *Rev Acad Med Zulia* 1998; 31:57-64.
72. **Uehara Y, Hirawa N, Takeda T, Numabe A, Kawabata Y, Nagoshi H, Gomi T, Ikegami J, Gotio A, Omata M.** Possible linkage between renal injury and cardiac remodeling in Dahl salt-sensitive rats treated with the calcium channel antagonist benidipine. *Hypertens Res* 1995; 245-253.
73. **Yasujima M, Abe K, Kanazawa M, Yoshida K, Kohzaki M, Sato M, Takeuchi K, Omata K, Tsunoda K, Kudo K, Ota K, Kimura T, Yoshinaga K.** Effects of anti-hypertensive drugs on renal function and atrial natriuretic polypeptide in spontaneously hypertensive rats with renal ablation. *Tohoku J Exp Med* 1989; 158:85-94.
74. **Shirakura S, Sano J, Karasawa A, Kubo K.** Protective effect of benidipine against development glomerular sclerosis in experimental nephritic syndrome. *Jpn J Pharmacol* 1992; 59:461-467.
75. **Hirasawa M, Pittman QJ.** Nifedipine facilitates neurotransmitter independently of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:6139-6144.
76. **Tamaki T, Abe Y.** Control of renal circulation with special reference on Nitric Oxide. *Asia Pacific J Pharmacol* 1994; 9:97-112.
77. **Zoja C, Benigni A, Camozzi D, Corna D, Longaretti L, Todeschini M, Remuzzi G.** Combining lisinopril and L-arginine slows disease progression and reduces endothelin-1 in passive Heyman nephritis. *Kidney Int* 2003; 64:863-867.
78. **Reyes AA, Purkerson ML, Karl I, Klahr S.** Dietary supplementation with L-arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Am J Kidney Dis* 1992; 20:168-176.
79. **Ferrer-Córdova JC, Tovar-Aranguren M, Ávila-Hernández R, Colina-Araujo JA, Godoy-Godoy N, Colina-Chourio JA, Casanova-Romero PY, Bedeau-Castro V.** Niveles plasmáticos de endotelina₁ en sujetos sanos normotensos y sin historia familiar de hipertensión arterial. *Rev Acad Med Zulia* 1999; 32:48-54.