



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial esencial

Javier Sobrino Martínez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

ALTERACIONES DE LA BOMBA DE CALCIO EN LA HIPERTENSION ARTERIAL ESENCIAL

Tesis presentada por **Javier Sobrino Martínez** para
aspirar al Grado de Doctor en Medicina
Marzo, 1998

Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona



ANTONIO COCA PAYERAS, Profesor
Titular del Departamento de Medicina de la
Universidad de Barcelona,

CERTIFICA: Que la tesis doctoral que lleva
por título "Alteraciones de la bomba de calcio en la
hipertensión arterial esencial", realizada por D.
Javier Sobrino Martínez y dirigida por el que
suscribe, está en condiciones de ser leída ante el
tribunal correspondiente.

Lo que se hace constar a los efectos
oportunos en Barcelona a 20 de marzo de 1998.

ALVARO URBANO-MARQUEZ, Catedrático
del Departamento de Medicina de la Universidad
de Barcelona,

CERTIFICA: Que la tesis doctoral que lleva
por título "Alteraciones de la bomba de calcio en la
hipertensión arterial esencial", realizada por D.
Javier Sobrino Martínez y dirigida por el que
suscribe, está en condiciones de ser leída ante el
tribunal correspondiente.

Lo que se hace constar a los efectos
oportunos en Barcelona a 20 de marzo de 1998.

ALEJANDRO DE LA SIERRA ISERTE,

Profesor Asociado del Departamento de Medicina
de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICA: Que la tesis doctoral que lleva por título "Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial esencial", realizada por D. Javier Sobrino Martínez y dirigida por el que suscribe, está en condiciones de ser leída ante el tribunal correspondiente.

Lo que se hace constar a los efectos oportunos en Barcelona a 20 de marzo de 1998.

a mi madre

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. **Antonio Coca**, director de la presente Tesis Doctoral, que me ofreció la posibilidad de iniciarme como investigador en el estudio de la hipertensión arterial y puso a mi disposición los medios técnicos necesarios para ello. Además, sin su constante estímulo y su participación en la elaboración final del manuscrito esta tesis no se habría realizado.

Al Dr. **Alejandro de la Sierra**, codirector de esta Tesis Doctoral, artífice de la hipótesis de trabajo del proyecto, por su constante ayuda, apoyo y colaboración en la estructuración, elaboración y redacción de la Tesis, así como por su constante estímulo y exigencias.

Al Prof. Dr. **Alvaro Urbano-Márquez**, codirector de esta Tesis Doctoral, por la confianza depositada en mi trabajo asistencial e investigador.

A la Dra. **M. T. Aguilera**, por su constante apoyo y su ayuda en los distintos aspectos de las técnicas de laboratorio.

Al Dr. **Miquel Torres**, por su constante estímulo para la finalización de esta Tesis.

A **Laura y María Jesús** por su amistad sincera y desinteresada.

A la Srta. **Montserrat Compte**, por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al personal del Laboratorio de Bioquímica, Hormonología y Toxicología, por su desinteresada colaboración en el procesamiento de las muestras sanguíneas y permitirme la utilización de sus instalaciones.

A todos los pacientes que constituyen el material humano de esta tesis.

Al Hospital Clínic i Provincial de Barcelona por la concesión de una Beca que ha hecho posible la realización del proyecto de investigación que constituye esta tesis doctoral.

INDICE DE MATERIAS

| | |
|--|----|
| I. Justificación | 1 |
| II. Revisión bibliográfica | 5 |
| 1. La hipertensión arterial esencial como enfermedad de la membrana celular | 6 |
| 1.1. Introducción | 6 |
| 1.2. El sodio en la etiopatogenia de la hipertensión arterial esencial | 10 |
| 1.2.1. Aumento de la concentración intracelular de Na^+ | 11 |
| 1.2.2. Alteraciones de la difusión pasiva de Na^+ | 12 |
| 1.2.3. Alteraciones en la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ | 12 |
| 1.2.4. Alteraciones en el cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ | 14 |
| 1.2.5. Alteraciones en el contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ | 15 |
| 1.2.6. Alteraciones en el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ | 15 |
| 1.2.7. Alteraciones en el intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ | 16 |
| 1.2.8. Alteraciones en el intercambiador $\text{Na}^+\text{-Mg}^{2+}$ | 17 |
| 2. Metabolismo celular del calcio | 18 |
| 2.1. Introducción | 18 |
| 2.2. Los canales de calcio | 19 |
| 2.3. La ATPasa Ca^{2+} -dependiente. La bomba de Ca^{2+} | 20 |
| 2.3.1. Estructura y función de la bomba de calcio | 20 |
| 2.3.2. La interacción de la bomba de calcio con la calmodulina | 24 |
| 2.3.3. Regulación de la bomba de calcio | 26 |
| 2.3.4. La bomba de calcio del retículo sarcoplásmico | 27 |
| 2.4. El contratransporte $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ | 28 |
| 3. Hipertensión arterial y calcio | 30 |
| 3.1. Papel del consumo de calcio en la hipertensión arterial | 30 |
| 3.1.1. Evidencias epidemiológicas | 31 |
| 3.1.2. Marcadores biológicos | 32 |
| 3.1.3. Estudios de intervención | 33 |
| 3.2. El calcio intracelular en la hipertensión arterial | 34 |
| 3.3. Anomalías de la bomba de calcio en la hipertensión arterial | 37 |
| 3.3.1. Alteraciones de la fijación de calcio por las membranas celulares .. | 37 |
| 3.3.2. Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial experimental | 39 |
| 3.3.3. Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial esencial | 44 |
| III. Hipótesis y objetivos | 47 |

| | |
|---|----|
| IV. Material y métodos | 50 |
| 1. Selección de los pacientes | 51 |
| 1.1. Grupo control | 51 |
| 1.2. Grupo de pacientes con hipertensión arterial esencial | 51 |
| 2. Metodologías | 52 |
| 2.1. Medida de la presión arterial | 52 |
| 2.2. Metodología del análisis bioquímico y hormonal | 53 |
| 2.3. Metodología del ecocardiograma | 53 |
| 2.4. Determinación de los parámetros cinéticos de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente | 54 |
| 2.4.1. Preparación de los eritrocitos | 55 |
| 2.4.2. Procedimiento de carga | 55 |
| 2.4.3. Determinación de Sr^{2+} y Ca^{2+} intraeritrocitarios | 56 |
| 2.4.4. Determinación del flujo de Sr^{2+} | 56 |
| 2.4.4. Cálculo de la afinidad aparente de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente para el Sr^{2+} intracelular y de la velocidad máxima de la salida de Sr^{2+} | 57 |
| 2.4.5. Cálculo de la afinidad aparente para el Ca^{2+} intracelular | 59 |
| 3. Análisis estadístico | 61 |
| 3.1. Pruebas estadísticas utilizadas | 61 |
| 3.2. Soporte informático | 61 |
| V. Resultados | 63 |
| 1. Características generales de la serie | 64 |
| 1.1. Grupo control | 64 |
| 1.1.1. Descripción de los parámetros | 64 |
| 1.2. Grupo de pacientes con HTA esencial | 68 |
| 1.2.1. Descripción de los parámetros | 68 |
| 2. Diferencias entre los parámetros cinéticos obtenidos en el grupo control y en los pacientes con HTA esencial | 72 |
| 3. Relación de los parámetros cinéticos de la bomba de calcio con los parámetros analizados | 74 |
| 3.1. Serie global | 74 |
| 3.1.1. Relación de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} con los parámetros estudiados | 74 |
| 3.1.2. Relación de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular con los parámetros estudiados | 75 |
| 3.2. Grupo de pacientes con HTA esencial | 76 |
| 3.2.1. Relación de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} con los parámetros estudiados | 76 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2. Relación de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular con los parámetros estudiados | 78 |
| 4. Clasificación de los pacientes con HTA esencial | 79 |
| 5. Diferencias clínico-biológicas entre los subgrupos de pacientes hipertensos | 80 |
| VI. Discusión | 86 |
| VII. Resumen y conclusiones | 90 |
| VIII. Bibliografía | 96 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabla 1. | Valores medios (\pm DE) de los parámetros clínicos, bioquímicos y ecocardiograficos básicos en los 27 individuos que constituyen el grupo control | 65 |
| Tabla 2 | Valores medios (\pm DE) de los parámetros cinéticos de la bomba de calcio en los 27 individuos que constituyen el grupo control | 66 |
| Tabla 3 | Valores medios (\pm DE) de los parámetros clínicos, bioquímicos, hormonales y ecocardiograficos básicos en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales | 69 |
| Tabla 4 | Valores medios (\pm DE) de los parámetros cinéticos de la bomba de calcio en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales | 70 |
| Tabla 5. | Parámetros que muestran una relación directa con la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} | 74 |
| Tabla 6. | Parámetros que muestran una relación directa con la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular | 75 |
| Tabla 7. | Comparación de los diferentes parámetros clínicos entre los pacientes hipertensos esenciales con constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal o elevada | 80 |
| Tabla 8. | Comparación de los diferentes parámetros bioquímicos, hormonales y ecocardiográficos entre los pacientes hipertensos esenciales con constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal o elevada | 84 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de reacción de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente | 24 |
| Figura 3. Histograma de la distribución en frecuencias de los valores individuales de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los 27 individuos que constituyen el grupo control | 66 |
| Figura 4. Histograma de la distribución en frecuencias de los valores individuales de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en los 27 individuos que constituyen el grupo control | 67 |
| Figura 5. Histograma de la distribución en frecuencias de los valores individuales de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales | 70 |
| Figura 6. Histograma de la distribución en frecuencias de los valores individuales de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales | 71 |
| Figura 7. Diagrama de barras de los valores medios (\pm desviación estándar) de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los 49 hipertensos esenciales y los 27 controles | 72 |
| Figura 8. Diagrama de barras de los valores medios (\pm desviación estándar) de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total (K_{ca}) en los 49 hipertensos esenciales y los 27 controles | 73 |
| Figura 9. Correlacion directa entre la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} y la edad de los pacientes hipertensos esenciales | 76 |
| Figura 10 Correlacion directa entre la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} y las cifras de creatinina de los pacientes hipertensos esenciales | 77 |
| Figura 11 Correlacion directa entre la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular y las cifras de creatinina de los pacientes hipertensos esenciales. | 78 |
| Figura 12 Gráfico de sectores que muestra la prevalencia de la alteración de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en la población de hipertensos esenciales | 79 |

Figura 13 Diagrama de barras de la edad media (\pm desviación estándar) en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular 81

Figura 14 Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) de la creatinina plasmática en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular 82

Figura 15 Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) del ácido úrico en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular 83

Figura 16 Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular 85

Principales abreviaturas utilizadas en el texto

| | |
|------------------|--|
| AMP | Adenosinmonofosfato |
| AMPC | Adenosinmonofosfato cíclico |
| ATPasa | Adosintrifosfatasa |
| Bomba (-) | Paciente con disminución de la afinidad aparente de la ATPasa Ca^{2+} para el Ca^{2+} intracelular |
| HTA | Hipertensión arterial |
| HTAe | Hipertensión arterial esencial |
| Hto | Hematocrito |
| K_{Ca} | Constante de disociación aparente para el Ca^{2+} |
| PA | Presión arterial |
| PAD | Presión arterial diastólica |
| PAM | Presión arterial media |
| PAS | Presión arterial sistólica |
| PTH | Hormona paratiroidea |
| RS | Retículo endosarcoplásmico |
| SHR | Ratas espontaneamente hipertensas |
| V_{max} | Velocidad máxima |
| WKY | Ratas normotensas Wistar-Kyoto |

I. Justificación

La hipertensión arterial (HTA) esencial es la enfermedad más frecuente de cuantas afectan a la humanidad y su prevalencia se cifra entre el 20 y el 25 por ciento de la población adulta. Gran número de estudios demuestran que a mayor presión arterial (PA), mayores son la morbilidad y la mortalidad de causa cardiovascular; lo que avala el hecho de que constituya uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. La evidencia acumulada hasta el momento hace suponer que la HTA esencial se desarrolla por la acción combinada de dos grupos de factores: factores genéticos, demostrados por la existencia de una importante agregación familiar de esta enfermedad y factores ambientales diversos. Entre estos últimos se han implicado las dietas ricas en cloruro sódico y pobres en calcio, la ingesta alcohólica, las dietas hipercalóricas y el estrés.

En la última década ha existido un creciente interés ante la posibilidad de que la HTA esencial pueda estar causada por una alteración en la homeostasis intracelular de algunos iones, especialmente el Na^+ y el Ca^{2+} . El avance producido en el conocimiento del metabolismo iónico a nivel celular y más concretamente, de los mecanismos que regulan su transporte a través de las membranas celulares, ha permitido la detección de diversas anomalías caracterizadas por un déficit en la función de las proteínas transportadoras. Este hecho ha permitido sentar las bases moleculares de la relación existente entre el consumo de sal y la HTA esencial.

En el Servicio de Medicina Interna General del Hospital Clinic i Provincial de Barcelona ha existido desde hace ya varios años un marcado interés en la

investigación de los mecanismos implicados en la etiopatogenia de la HTA esencial. El estudio del transporte de Na^+ a través de la membrana celular fué iniciado por el director de esta tesis, el Dr. A Coca¹, que demostró la existencia de una alteración del flujo catiónico activo en los eritrocitos de los pacientes hipertensos esenciales y de sus hijos normotensos. Posteriormente, el Dr. A de la Sierra² pudo clasificar a los hipertensos esenciales en subgrupos atendiendo a las anomalías en los sistemas de transporte transmembranario de Na^+ y a la existencia de características clínicas diferenciales. La presente tesis doctoral continua la línea iniciada por este Grupo de Investigación y pretende aportar nuevos aspectos sobre la implicación del Na^+ y su relación con el Ca^{2+} y sus sistemas de transporte, dado que el contenido intracelular de estos dos iones y su regulación parecen estar interrelacionados. Puesto que el Na^+ intracelular ejerce su efecto presor a través del incremento en el contenido de Ca^{2+} , resulta lógico pensar que una alteración en los mecanismos que regulan el transporte de este catión y, más concretamente la ATPasa Ca^{2+} -dependiente, pueden tener relación con la etiopatogenia de la HTA. Cabe decir al respecto que uno de los miembros de nuestro grupo ha puesto de manifiesto la existencia de una alteración en la función cinética de dicha ATPasa en un pequeño número de pacientes hipertensos esenciales³.

La presente tesis doctoral pretende demostrar la existencia de un subgrupo de hipertensos esenciales caracterizados por anomalías de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente entre los pacientes afectados de HTA esencial de nuestro medio.

No obstante, este estudio no se detiene a un nivel puramente experimental. Cabe esperar que con una muestra amplia, este subgrupo de hipertensos esenciales presente características clínicas que lo diferencie del resto de hipertensos, hecho que parece vislumbrarse en nuestros trabajos previos, aunque las muestras utilizadas han sido generalmente poco significativas. La posibilidad de establecer una correlación clínico-celular supondría un paso importante hacia la redefinición de la HTA esencial como un síndrome, en el que se incluirían diferentes entidades nosológicas diferenciables tanto en el aspecto clínico como en el de la biología celular.

II. Revisión bibliográfica

1. La hipertensión arterial esencial como enfermedad de la membrana celular.

1.1. Introducción.

El conocimiento acumulado hasta la actualidad, hace suponer que la hipertensión arterial esencial (HTAe) se desarrolla por la acción combinada de al menos dos grupos de factores: factores genéticos y factores ambientales de diversa índole, entre los que se han implicado el excesivo consumo de sal y las dietas con un pobre contenido en calcio, magnesio y potasio.

La posibilidad de que la HTAe pueda ser causada por una alteración en la homeostasis intracelular de estos iones, ha sido motivo de un creciente interés en la última década. El avance producido en el conocimiento del metabolismo iónico a nivel celular y, más concretamente, de los mecanismos que regulan su transporte a través de las membranas celulares, ha hecho posible la detección de diversas anomalías caracterizadas por un déficit en la función de las proteínas transportadoras. Estas alteraciones descritas a nivel del metabolismo iónico celular han permitido sentar las bases moleculares de la relación existente entre el consumo de sodio, calcio, magnesio y potasio, y la HTAe.

El progresivo incremento de las cifras de presión arterial (PA) que se observa con el aumento de edad en las civilizaciones desarrolladas parece ser un evento filogenético reciente, atribuible en gran parte al uso de la sal como aditivo de los

alimentos⁴. En los últimos 5.000 años, el desarrollo de la tecnología necesaria para la obtención de la sal común procedente de las minas o del agua del mar ha permitido al ser humano la conservación de los diferentes alimentos en forma de salazón. En aras a evitar el crecimiento bacteriano y fúngico, la conservación mediante sal común requiere de altas concentraciones de cloruro sódico por gramo de tejido. Probablemente, el paladar de las sucesivas generaciones se ha ido adaptando de manera progresiva a estas altas dosis y su resultado ha sido el uso de sal como apreciado condimento. Este hecho podría ser la explicación de que el consumo habitual de cloruro sódico sea del orden de 10 a 30 veces superior a las necesidades fisiológicas del ser humano⁵.

Ambard y Beaujard⁶ sugirieron, hace ya más de 80 años, que el excesivo consumo de sal en la dieta podía ser el responsable del aumento de las cifras de PA de algunos individuos. Desde entonces, gran número de estudios epidemiológicos⁷⁻⁹, experimentales^{10,11} y clínicos¹²⁻¹⁴ han dado soporte a las primeras observaciones y corroborado la inequívoca relación entre el consumo de sal y la HTAe.

El intento de extrapolar conclusiones emergentes de datos epidemiológicos a experiencias individuales en la clínica ha generado innumerables controversias. Desde un punto de vista general, la hipótesis "sal-hipertensión" sostiene que la mayoría de los humanos son sensibles a la exposición a la sal. Sin embargo, únicamente algunos individuos responden con descensos de presión frente a la restricción salina, lo que sugiere una susceptibilidad individual a la sal¹⁵ de modo

similar a lo que sucede en el animal de experimentación¹¹.

Contrariamente a la sal común, cuya relación con la HTA se sospecha desde hace casi 100 años, las primeras observaciones que relacionaban el consumo de calcio con el riesgo cardiovascular fueron publicadas hace apenas tres décadas¹⁶. Estos trabajos iniciales permitieron demostrar que las comunidades que consumían un agua más dura presentaban índices más bajos de muerte por enfermedad cardiovascular^{17,18}.

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos¹⁹⁻²⁵ han identificado el bajo consumo de calcio en la dieta como un factor de riesgo para el desarrollo de la HTA. Esta relación ha persistido incluso después de controlar variables tales como la edad, raza, sexo, peso y consumo de alcohol. Otros factores implicados por dichos estudios, tales como las dietas deficitarias en potasio, magnesio o fósforo pueden ser explicadas por el hecho de que la principal fuente de calcio de la alimentación es también la principal fuente de estos otros componentes. En líneas generales puede decirse que una persona que consume por término medio una dieta con 300 mg diarios de calcio tiene un riesgo para el desarrollo de HTA entre un 11% y un 14% superior a otro de su misma edad, sexo y raza que consuma 1200 mg diarios¹⁹.

A esta evidencia de tipo epidemiológico hay que añadir otra derivada de la existencia de algunos trastornos del metabolismo del calcio detectados en pacientes y animales afectos de HTAe. Entre ellos, el más importante es el hallazgo de unos niveles bajos de calcio iónico sérico^{26,27}. Un estudio de

McCarron et al²⁶ demostró una disminución del calcio sérico total en los pacientes hipertensos mientras que, paradójicamente, en algunos otros se puso en evidencia una correlación positiva entre los valores de PA y el calcio sérico²⁰. Estas observaciones contradictorias podrían ser debidas a la falta de corrección, en estos últimos, de la relativa hemoconcentración presente en muchos pacientes hipertensos, de modo que el aumento de los niveles de calcio sérico total serían reflejo del aumento de la concentración de albúmina²¹. Tal como lógicamente podrían predecir unos niveles de calcio iónico sérico bajo, los niveles de hormona paratiroidea se han encontrado elevados en pacientes hipertensos^{22,28}, en estos estudios, el aumento de la hormona paratiroidea se asociaba a un aumento en la excreción urinaria de AMP cíclico. Otro indicador de la alteración del metabolismo del calcio, el descenso en los niveles de fosfato sérico, ha sido observada en la HTAe^{22,26,29,30} al tiempo que la existencia de una correlación inversa entre niveles de fósforo y valores de presión arterial^{30,31}.

Otra evidencia adicional que relaciona el calcio con la HTA deriva de los estudios terapéuticos del grupo de McCarron³² en los que se demuestra un descenso en las cifras de PA en casi la mitad de los hipertensos esenciales tratados con suplementos de calcio. Asimismo, Erne et al³³ demostraron un incremento de la concentración intraplaquetaria de calcio en pacientes afectados de HTAe.

En resumen, los datos de los que disponemos hasta la actualidad no son concluyentes por lo que respecta a la existencia de una clara relación entre un trastorno subyacente del metabolismo del calcio y la etiopatogenia de la HTAe.

En este sentido, al igual que ocurrió hace años con el sodio, la mayor evidencia que implica dicha alteración como causa de la HTA ha surgido de los estudios a nivel del metabolismo celular de este catión.

1.2. El sodio en la etiopatogenia de la HTA

La hipótesis de que la HTA esencial se relacionaba con alteraciones del contenido intracelular de Na^+ , fue descrita por primera vez por Tobian y Binion³⁴ en 1952, al detectar en exámenes "postmortem", un aumento del contenido intracelular de Na^+ en la fibras musculares lisas de arterias renales procedentes de individuos hipertensos esenciales. Desde entonces, y hasta nuestros días, se han confirmado algunos de los resultados iniciales, y se han caracterizado diferentes anomalías genéticas de los sistemas enzimáticos que catalizan el transporte de Na^+ a través de las membranas celulares y, asimismo, se ha podido detectar la presencia de sustancias plasmáticas circulantes capaces de modular la actividad de estos sistemas en los hipertensos esenciales³⁵. A pesar de que la gran profusión de datos referidos en la literatura médica muestran en ocasiones resultados contradictorios, las anomalías descritas tienden a provocar, en la mayoría de los casos, aumentos en la concentración intracelular de sodio³⁶. La HTAe es una entidad clínica mediada eminentemente por un aumento de las resistencias periféricas, lo que en gran medida es debido al aumento del tono de la fibra muscular lisa vascular. La dificultad que supone el acceso a estas fibras

en los pacientes hipertensos, así como los problemas éticos que plantea, han condicionado la utilización de células hemáticas circulantes en la investigación clínica, especialmente hematíes, por su fácil obtención y manejo. Aunque estas células no se hallan directamente implicadas en los mecanismos que regulan la presión arterial, su estudio debe considerarse como un modelo de lo que ocurre en otros lugares del organismo. Es de destacar al respecto, que la mayoría de los sistemas de transporte transmembranario de Na^+ son comunes a todas las células del organismo y que las alteraciones halladas en hematíes y leucocitos se han reproducido en células de fibras musculares lisas vasculares, células del túbulo renal y neuronas noradrenérgicas procedentes de animales de experimentación.

1.2.1. Aumento de la concentración intracelular de Na^+

En 1960, Losse et al³⁷ observaron un aumento del contenido de Na^+ en hematíes de individuos con hipertensión esencial. Desde entonces, numerosos autores han corroborado dichos hallazgos, tanto en pacientes hipertensos³⁸⁻⁴⁰ como en ratas espontáneamente hipertensas⁴¹, e incluso en individuos normotensos con antecedentes en familiares de primer grado de HTAe⁴².

No obstante, dado que el metabolismo celular del Na^+ depende básicamente de sus sistemas de transporte transmembranario, el aumento de contenido intracelular podría ser secundario a alguna anomalía en estos sistemas.

1.2.2. Alteraciones de la difusión pasiva de Na^+

Garay y Nazaret⁴³ demostraron la existencia de un aumento del flujo de salida de Na^+ por difusión pasiva en eritrocitos de algunos hipertensos esenciales, y consiguieron así caracterizar a un subgrupo de pacientes cuyos valores de difusión pasiva eran claramente superiores a los límites más altos de la normalidad. El defecto de permeabilidad pasiva que presentaban los hematíes de estos pacientes ha sido definido como anomalía "Leak (+)".

Este aumento ha sido confirmado también por Wessels y Zumkley⁴⁴, así como por De la Sierra et al⁴⁵, y puede ser detectado entre el 1% y el 12% de los hipertensos esenciales de nuestra población⁴⁵. El que en estos pacientes la concentración intracelular de Na^+ sea normal o alta, puede depender de la existencia y magnitud de un aumento simultáneo de las velocidades de extrusión de Na^+ por parte de la ATPasa Na^+-K^+ y del cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$, que actúan como sistemas compensadores de esta anomalía.

1.2.3. Alteraciones en la ATPasa Na^+-K^+

La bomba de sodio se halla virtualmente presente en todas las membranas del organismo y el flujo de Na^+ dependiente de ella puede variar por la acción de sustancias moduladoras de su actividad, por modificaciones en el número de unidades proteicas de bomba de la membrana celular, o por alteraciones de la afinidad de la bomba por el Na^+ intracelular.

El intento de identificar una sustancia natriurética "oubaína-like" y su implicación

en la génesis de la HTAe, ha sido una constante en la literatura médica. En los últimos años ha existido un renovado interés por el aislamiento y caracterización de inhibidores circulantes de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, que ha culminado con la reciente purificación e identificación estructural de una sustancia endógena, presente en el plasma humano a niveles subnanomolares, que se fija a los receptores de los glicósidos digitálicos con alto grado de afinidad y es indiferenciable de la oubaína. Esta "oubaína-like" humana inhibe la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y la entrada de $^{86}\text{Rb}^+$ a la célula, y disminuye la velocidad máxima de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, por lo que sería responsable de una anomalía adquirida de la bomba de Na^+ . Las mayores concentraciones de esta sustancia han sido detectadas en la suprarrenales, lo cual sugiere que estas glándulas y no el hipotálamo, son la fuente del compuesto circulante⁴⁶.

En un estudio de las propiedades cinéticas de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en una población de hipertensos esenciales, Díez et al⁴⁷ consiguieron identificar a un subgrupo de pacientes que, de manera estable, presentaban una disminución de la afinidad aparente de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ para el Na^+ intracelular. En la mayoría de los hipertensos con este defecto, definido como anomalía "Na⁺ Bomba (-)", la velocidad máxima de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ puede hallarse aumentada como mecanismo compensador (anomalía "bomba (+)"). Estos resultados son similares a los observados por nuestro grupo⁴⁸ y sugieren que, entre el 8% y el 25% de los hipertensos esenciales presentan una anomalía intrínseca de la bomba de Na^+ que no depende de la presencia de un inhibidor circulante. Esta anomalía implica

la necesidad de mayores cifras de Na^+ intracelular para conseguir el mismo nivel de estimulación que un individuo normal.

1.2.4. Alteraciones en el cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$

Hace ya casi dos décadas, Garay y Meyer⁴⁹ demostraron un descenso de la actividad del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ en hipertensos esenciales, hallazgos que fueron confirmados por los mismos autores, tanto al estudiar la actividad en condiciones basales como en eritrocitos sometidos a una sobrecarga salina⁴⁹⁻⁵⁰. Existen marcadas diferencias raciales, y parece evidente que en la raza negra se distribuye el mayor porcentaje de individuos con un cotransporte anormalmente bajo⁵¹⁻⁵².

Posteriormente, Garay et al⁵³ constataron la existencia de un subgrupo de pacientes con una anomalía del cotransporte, consistente en una disminución de la finidad aparente del sistema para el Na^+ intracelular, este defecto estable fue definido como anomalía "Co (-)" y se detecta entre el 18% y el 39% de los hipertensos⁵⁴. Al igual que la anomalía "Bomba (-)", determina una dificultad en la extrusión de Na^+ , pues se requieren mayores concentraciones intracelulares del catión para conseguir un nivel de estimulación similar al del individuo normal. En los hipertensos con la anomalía "Co (-)", la velocidad máxima del sistema puede estar aumentada como mecanismo compensador (anomalía "Co (+)"), ser normal o estar disminuida.

1.2.5. Alteraciones en el contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$

En 1980, Canessa et al⁵⁵ describieron un aumento de la actividad del contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ en pacientes afectados de HTAe. La mayoría de investigadores que han estudiado este sistema de transporte han corroborado en aumento de la velocidad máxima de este sistema en la población de hipertensos esenciales⁵⁵⁻⁶⁰, así como en individuos normotensos con antecedentes familiares de HTA⁶¹. La prevalencia de esta anomalía, definida como "Contra (+)", en sujetos hipertensos es muy variable y viene influenciada por la raza, edad, y existencia de historia familiar previa de HTA⁶²⁻⁶³. En nuestro medio es una de las anomalías más frecuentes y afecta entre el 26% y el 49% de los hipertensos esenciales⁶⁴⁻⁶⁵.

1.2.6. Alteraciones en el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$

Livne et al⁶⁶ describieron en 1987 la existencia de un aumento de la actividad del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ tras sobrecarga ácida en plaquetas de hipertensos esenciales, hallazgos confirmados por otros autores en el mismo modelo celular⁶⁷. La actividad de este intercambiador se correlaciona con las cifras de presión arterial diastólica y su hiperactividad se ha detectado en hipertensos de diversas razas⁶⁷, al contrario de lo que sucede con la hiperactivación del contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ eritrocitario, prácticamente inexistente entre los hipertensos de raza negra⁶²⁻⁶³.

También se ha detectado la hiperactivación del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ en el

modelo celular eritrocitario de hipertensos esenciales, defecto definido como anomalía "Proton (+)" y cuya prevalencia oscila entre el 20% y el 80% de los hipertensos estudiados, según diferentes investigadores⁶⁸⁻⁷¹, siendo en nuestro medio del 60%⁶⁹. Estos pacientes representan un grupo con características clínicas y biológicas bien definidas, tales como un mayor índice de masa ventricular izquierda, tendencia a presentar valores mas elevados de glucemia, y un particular perfil lipidico caracterizado por cifras superiores de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos⁶⁹. No se sabe con certeza si la hiperactividad de este intercambiador está genéticamente determinada, o es un epifenómeno en el curso de la enfermedad hipertensiva, dado que algunas observaciones recientes sugieren esta última posibilidad⁷¹.

1.2.7. Alteraciones en el intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$

Ya en esta década, Diez et al⁷² observaron que la actividad eritrocitaria del intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ dependiente del Na^+ estaba anormalmente elevada en un 23% de hipertensos. Esta alteración del transporte transmembranario de sodio, definida como "Anion (+)", permanece estable a lo largo de la evolución de la enfermedad. Al analizar las posibles características diferenciales de los pacientes portadores de esta anomalía respecto a los hipertensos con una actividad normal de este sistema de transporte, estos mismos autores⁷³ observan una frecuencia superior de antecedentes familiares de HTA, así como niveles inferiores de HDL-colesterol y superiores de aldosterona plasmática, lo que

sugiere que estos individuos podrían representar un subgrupo particular entre los hipertensos esenciales.

1.2.8. Alteraciones en el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Mg}^{2+}$

Muy recientemente, Picado et al⁷⁴ han observado una aceleración en la velocidad máxima del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Mg}^{2+}$ en hematíes de un subgrupo de pacientes hipertensos, que representaban el 45% de todos los hipertensos esenciales estudiados, y con una presión arterial diastólica más elevada que la de los pacientes sin aceleración de este intercambiador.

2. Metabolismo celular del calcio

2.1. Introducción.

El Ca^{2+} penetra en el citosol celular desde el medio extracelular y desde el retículo endo(sarco)plásmico (RS) a través de canales propios, cuyo control depende de receptores específicos, de mensajeros intracelulares o de cambios en el potencial de membrana, dando lugar a un aumento transitorio de su concentración citosólica⁷⁵. Tras ejercer su acción es extraído de nuevo al medio extracelular y recaptado al interior del retículo endo(sarco)plásmico por sistemas de transporte activo.

La concentración de Ca^{2+} extracelular es de aproximadamente 1 mmol/litro, mientras que en el interior de la célula el Ca^{2+} libre citosólico alcanza concentraciones 10.000 veces inferiores, de rango nanomolar (100 a 200 nmol/litro). Existe por tanto un gradiente transmembranario extraordinariamente elevado⁷⁵. No sólo la membrana citoplasmática regula el Ca^{2+} intracelular, pues las membranas mitocondriales y las del RS juegan un importante papel en la homeostasis cálcica. En el interior de la matriz mitocondrial se acumula calcio, en forma de compuestos no iónicos con fosfato y ATP⁷⁶. Por su parte, el RS juega un importante papel en la regulación del Ca^{2+} citosólico y en la contracción de las fibras musculares, en particular en la contracción cíclica de la célula miocárdica^{75,77}. No obstante, este retículo sirve como fuente del Ca^{2+} necesario para iniciar una respuesta dependiente del catión, pero no es un compartimento

encargado de regular constantemente su concentración intracelular. Es fundamentalmente la membrana citoplasmática la responsable de la homeostasis del Ca^{2+} , lo que consigue merced a unos sistemas de transporte capaces de extraerlo al medio extracelular y mantener el gradiente transmembranoso.

2.2. Los canales de calcio

La entrada de calcio extracelular a favor de su gradiente electroquímico se realiza a través de canales específicos de la membrana, los canales de calcio, de los que existen dos tipos:

1/ Los voltaje dependientes, que se activan y permiten la entrada de calcio en respuesta a cambios del potencial de membrana.

2/ Los receptor-dependientes, que se activan cuando un agonista, como la noradrenalina o la angiotensina II, actúan sobre sus receptores situados en la membrana celular.

En las células de la musculatura lisa vascular parecen existir ambos tipos, mientras que en las células cardíacas parecen ser exclusivamente voltaje-dependiente. De estos últimos, voltaje-dependientes, existen tres tipos denominados L, T y N ⁷⁸, que presentan distintas características cinéticas y farmacológicas. Tanto en las células cardíacas como en las musculares lisas vasculares no se ha podido demostrar la existencia de los canales N que son los que predominan en las células nerviosas. Los canales L se activan cuando el potencial de membrana se desplaza por encima de -30 mV y se inactivan muy

lentamente permitiendo aperturas de larga duración, y la entrada de calcio a través de estos canales sería la responsable a nivel cardiovascular de: el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco y liso vascular, de la fase 2 del potencial de acción cardíaco y de la velocidad de despolarización de los nodos senoauricular y auriculoventricular. Los canales T se activan a niveles de potencial de membrana de -80 mV y se inactivan rápidamente, permitiendo aperturas transitorias, y parecen estar involucrados en la génesis de la fase 4, de lenta despolarización diastólica de las células marcapaso cardíacas y vasculares⁷⁹.

2.3. La ATPasa Ca^{2+} -dependiente. La bomba de Ca^{2+} .

2.3.1. Estructura y función de la bomba de calcio

La ATPasa Ca^{2+} dependiente es uno de los siete u ocho mecanismos de transporte existentes en las membranas celulares que movilizan el calcio entre el interior y el exterior de la célula. Junto con el contrartransporte Na^+ - Ca^{2+} es el principal mecanismo para la extrusión de calcio del citoplasma celular y está presente en la práctica totalidad de las membranas celulares. En general, la ATPasa predomina en las células no excitables y el contrartransporte en las excitables⁸⁰. Ello es debido a que estas últimas requieren un sistema de alta capacidad de transporte aunque sea en detrimento de la afinidad para el calcio,

condiciones que se hallan presentes en el intercambiador Na^+ - Ca^{2+} . Por el contrario, la ATPasa Ca^{2+} -dependiente presenta una alta afinidad para el Ca^{2+} y una menor capacidad de transporte y es, por tanto, la responsable del mantenimiento constante del bajo contenido de calcio existente en el interior celular.

La demostración en 1966 de que los eritrocitos eran capaces de extrudir Ca^{2+} gracias a una ATPasa específica⁸¹ originó un vasto número de trabajos, realizados principalmente en este modelo celular, encaminados a conseguir la caracterización de esta enzima. Se trata de una clásica E_1 - E_2 ATPasa con una alta afinidad para el Ca^{2+} ($< 1 \mu\text{M}$), que se inhibe específicamente por bajas concentraciones de vanadato ($K_{1/2} < 1 \mu\text{M}$). Gracias a esta alta afinidad está cualificada para extraer Ca^{2+} continuamente de la célula, por lo que juega el papel más importante en el mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} entre las células y el medio extracelular.

La ATPasa Ca^{2+} -dependiente es un polipéptido con un peso molecular de 138.000 daltons en su forma monomérica, aunque funciona en la membrana celular como un dímero⁸²⁻⁸⁴. Su representación en el total de proteínas membranas es baja, con sólo un 0,1%-0,2% del total de las mismas, que a su vez constituyen únicamente alrededor del 0,5% del peso celular.

En presencia de la enzima reguladora calmodulina, las propiedades de la ATPasa eritrocitaria, aquella que ha podido ser mejor estudiada, son relativamente bien conocidas. La bomba transporta, aparentemente, el

equivalente al influjo pasivo de Ca^{2+} que se cifra en unos 50 $\mu\text{mol/l.cel/h}$ a una concentración interna de Ca^{2+} inferior a los 30 nmol/l.cels^{85} . Si tenemos en cuenta que la concentración extracelular de Ca^{2+} se halla alrededor de 1,3 mmol/l puede establecerse un gradiente en contra de 40.000. De este modo puede afirmarse que únicamente una pequeña parte de la capacidad de la bomba se utiliza habitualmente. Si la concentración de calcio intracelular se satura (10 $\mu\text{mol/l.cels}$) la velocidad de transporte puede alcanzar los 20 mmol/l.cels/h , lo que corresponde a varios miles de unidades por minuto. La afinidad para el calcio es alta en el interior (inferior a 1 μM) y baja en el exterior de la membrana (10 mM)⁸⁶. El sistema hidroliza ATP a la misma velocidad a la que se transporta el calcio (1 átomo de calcio transportado por molécula de ATP hidrolizado)⁸⁷. Existen dos sitios o locus de fijación del ATP. El locus enzimático propiamente dicho presenta una afinidad de 2-3 μM , operando aisladamente a una décima parte de su capacidad. Además, existe otro locus regulador para el ATP con una afinidad entre 200 y 300 μM que cuando está ocupado permite el funcionamiento a velocidad máxima⁸⁸.

Es importante destacar que el sistema requiere la presencia del ion Mg^{2+} para su operatividad. La afinidad para el Mg^{2+} en el interior de la membrana es de 15 μM^{89} , lo que no implica que el sistema transporte este catión. De hecho, la especificidad de la bomba para el calcio es altamente selectiva⁹⁰, permitiendo únicamente el Sr^{2+} y, posiblemente el Pb^{2+} como alternativa al transporte de Ca^{2+} .

Está claramente establecido que la bomba de calcio no contrartransporta ningún otro catión al interior celular, aunque inicialmente se había postulado su intercambio por Na^+ , K^+ o Mg^{2+} , ni es intercambiado por un ningún anión⁹¹. No obstante, existen evidencias experimentales⁹² que sugieren la posibilidad de un intercambio por protones, es decir, que el sitio móvil de fijación del Ca^{2+} volvería al interior celular unido a un H^+ . Ello viene apoyado por el hecho de que cuando se bloquea el transportador de aniones con DIDS, aquellos aniones que pasan la membrana en forma no disociada, como el acetato, estimulan el transporte de calcio, mientras que los que la atraviesan en forma ionizada, como el tiocianato, no presentan esta propiedad.

El ciclo de reacción de la bomba de calcio (figura 1) es similar al de otras ATPasas como la bomba de sodio. Básicamente, la hidrólisis del ATP fosforila la proteína en presencia de calcio.

La proteína fosforilada cambia su conformación de $\text{E}_1\text{-P}$ a $\text{E}_2\text{-P}$, cambio que se ve favorecido por la presencia de Mg^{2+} . Durante este cambio de conformación el Ca^{2+} es extruído al exterior para posteriormente desfosforilarse la proteína y volver a su conformación inicial⁹³.

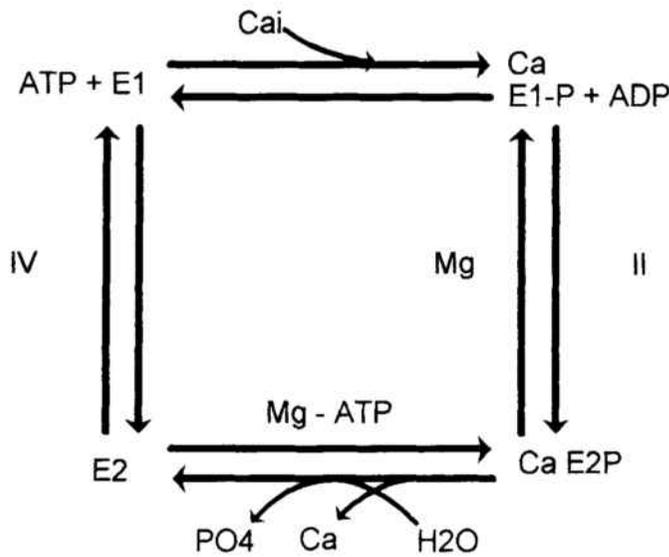


Figura 1. Ciclo de reacción de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente. El ciclo comienza en el extremo superior izquierdo y sigue el sentido horario. E1 y E2 representan las dos conformaciones de la proteína y E1-P y E2-P las formas fosforiladas: El Ca^{2+} atraviesa la membrana celular durante la reacción II. Dicha reacción requiere la presencia de Mg^{2+} , mientras que la III necesita altas concentraciones de ATP.

2.3.2. La interacción de la bomba de calcio con la calmodulina

Una importante característica de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente es su capacidad de estimulación por la acción de la calmodulina^{94,95}, proteína soluble intracelular con cuatro locus de fijación para el Ca^{2+} que se halla presente en el interior de todas las células y es la encargada de mediar en varias de las acciones en las que el Ca^{2+} actúa como segundo mensajero. La calmodulina estimula la bomba de calcio cuando varios de sus locus de fijación para este catión son ocupados. Esta reacción provoca una interacción calmodulina-bomba de calcio⁹⁶ que resulta en un incremento de hasta 30 veces de la afinidad de esta última para el Ca^{2+} .

Para algunos autores⁹⁷ la ATPasa Ca^{2+} -dependiente tendría dos configuraciones: una forma asociada a la calmodulina y otra disociada de esta. La forma disociada representaría un estado de baja afinidad donde la actividad máxima se consigue por una concentración de calcio libre comprendida entre 100 y 300 μM , presentando un solo locus de fijación para el calcio. Por el contrario, en su forma asociada a la calmodulina la bomba de calcio se convierte en una enzima de alta afinidad que alcanza su máxima actividad para una concentración de calcio libre citosólico de 10 a 50 μM y donde el número de locus de fijación para el calcio es de tres. El papel fisiológico de la regulación de la bomba de calcio por la calmodulina no está suficientemente aclarado. Para algunos autores, la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en su estado basal estaría disociada de la calmodulina y sería el aumento del calcio intracelular el que provocaría, a través de la ocupación de los locus específicos de la calmodulina, la asociación a la ATPasa Ca^{2+} -dependiente y el consiguiente aumento de su afinidad para el Ca^{2+} y de su velocidad máxima. Ello obtendría el resultado deseado, es decir, el restablecimiento de la concentración basal de calcio y, alcanzado dicho objetivo, la calmodulina se disociaría de nuevo de la bomba. Este fenómeno tiene implicaciones reguladoras, pues la calmodulina actuaría como un activador, capaz de modificar la conformación de la enzima desde un estado de baja afinidad para el Ca^{2+} y baja velocidad de bombeo, a un estado de características diametralmente opuestas. No obstante, otros autores ponen en duda esta hipótesis⁹⁸ y sugieren que en su estado basal el 98% de las unidades de la

calmodulina, con lo que el papel regulador de esta proteína intracelular sería prácticamente nulo.

2.3.3. Regulación de la bomba de calcio

Dejando aparte la regulación de la bomba de calcio por la calmodulina, que actúa como un mecanismo de feed-back negativo ante los aumentos del calcio libre citosólico, las características funcionales de la ATPasa de la membrana plasmática dependen en gran medida del ambiente lipídico en el que se halla inmersa⁹⁹. Los fosfolípidos, ya sean neutros o con carga negativa, son esenciales para su funcionamiento enzimático en condiciones basales¹⁰⁰. Si se reconstruye la ATPasa con un fosfolípido neutro como la fosfatidilcolina, la adición de otros fosfolípidos con carga negativa como la fosfatidilserina, el fosfatidilinositolmonofosfato o el fosfatidilinositolbifosfato son capaces de estimular de forma adicional la actividad de la ATPasa¹⁰¹. Si bien no está probado que esta regulación tenga algún papel fisiológico, sí parece factible que el fosfatidilinositolmonofosfato sea un regulador del transporte de Ca^{2+} por la bomba de la membrana celular.

Se ha descrito que el GMP cíclico ejerce un efecto estimulador sobre el transporte transmembranario de calcio y que dicho efecto se produce mediante una fosforilación directa de la enzima¹⁰². No obstante, otros autores¹⁰³ han demostrado que dicha enzima fosforilada no tiene las características de la bomba de calcio y que, probablemente, se trata de la kinasa de la cadena ligera de la

miosina. Esta kinasa dependiente del GMPc sí es capaz de estimular el transporte de calcio por la bomba, probablemente a través de la formación de fosfatidilinositolmonofosfato. De igual manera, aquellos agentes capaces de estimular la síntesis de GMPc, tales como el factor relajante dependiente del endotelio o el factor natriurético auricular, pueden descender el calcio libre citosólico a través de una estimulación indirecta de la actividad de la bomba de calcio¹⁰³.

Dependiendo del modelo celular existen diversas sustancias que pueden modular la actividad de esta enzima. La insulina es capaz de inhibir el transporte de calcio por la ATPasa¹⁰⁴ en la membrana de los adipocitos, mientras que en las células intestinales la 1,25-hidroxivitamina D₃ es capaz de activarlo¹⁰⁵. En las células del miometrio la oxitocina tiene funciones inhibitorias¹⁰⁶ mientras que en los eritrocitos las hormonas tiroideas son estimuladoras¹⁰⁷. Asimismo, se ha postulado que el efecto tóxico del cadmio sería debido a una inhibición la bomba de calcio de la membrana celular¹⁰⁸.

2.3.4. La bomba de calcio del retículo sarcoplásmico

En el retículo sarcoplásmico, la enzima responsable de introducir el Ca²⁺ libre citosólico en su interior es una ATPasa del mismo tipo que la de la membrana plasmática, que interacciona con el Ca²⁺ con una alta afinidad (< 0,5 μM) y con una estequiometría para el ATP de 2:1. Puesto que esta ATPasa es muy abundante en la membrana del retículo sarcoplásmico, superior al 90% del total

de las proteínas de membrana en algunos músculos esqueléticos, la organela puede captar rápidamente grandes cantidades del Ca^{2+} citosólico (de 20 a 40 nmol por miligramo de proteína de membrana y por segundo). La ATPasa Ca^{2+} -dependiente del retículo sarcoplásmico ha sido purificada y se trata de un polipéptido con un peso molecular de 115.000 daltons¹⁰⁹. Es capaz de estimularse también por la calmodulina, pero a diferencia de la ATPasa de la membrana celular, en que la estimulación es debida a la interacción directa del activador con la bomba, en el retículo sarcoplásmico esta activación está mediada por una quinasa calmodulina-dependiente. La regulación de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente del retículo sarcoplásmico se lleva a cabo por el fosfolomban, proteína presente tanto en el músculo cardíaco como en el músculo liso o esquelético¹¹⁰⁻¹¹². El fosfolomban ejerce su acción a través de la fosforilación mediada por diversas kinasas, ya sean dependientes de AMPc, de la calmodulina o del GMPc¹¹². De este modo, y al igual que sucedía con la bomba de calcio de la membrana citoplásmica, aquellas sustancias capaces de estimular el ciclo de las proteínas G y del fosfatidilinositol, como el factor natriurético auricular, el factor relajante dependiente del endotelio o incluso los beta-bloqueantes pueden ejercer su efecto de relajación por esta vía¹⁰³.

2.4. El contratransporte Na^+ - Ca^{2+}

En 1968 Reuter y Seitz¹¹³ propusieron la existencia de un mecanismo presente en la membrana citoplasmática de las células del miocardio capaz de

intercambiar Na^+ por Ca^{2+} . Este sistema se ha caracterizado en varios tejidos y parece jugar un papel primordial en la contracción muscular⁷⁵. El Intercambiador Na^+ - Ca^{2+} se encuentra en las membranas citoplasmáticas de múltiples tejidos, especialmente de las células excitables, aunque no en los hematíes humanos ni en las membranas de las organelas intracelulares^{75,114,115}. Es capaz de extrudir una molécula de Ca^{2+} intracelular intercambiándola por 3 moléculas de Na^+ procedentes del exterior, por lo que produce un influjo neto de cargas positivas y genera un gradiente electroquímico a ambos lados de la membrana. Este sistema tiene la facultad de actuar en ambos sentidos, lo que depende de las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} intra y extracelulares. Al contrario de lo que sucede con la Bomba de Ca^{2+} , el Intercambiador Na^+ - Ca^{2+} es un mecanismo de baja afinidad para el Ca^{2+} pero con una gran capacidad de estimulación, lo que le convierte en el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} tras el aumento masivo que tiene lugar con la despolarización en el citosol de las células excitables. No se han identificado hasta el momento los mecanismos fisiológicos que regulan este sistema de transporte aunque es conocido que algunas sustancias farmacológicas pueden inhibirlo, especialmente algunos derivados de la amilorida¹¹⁶.

3. Hipertension arterial esencial y calcio

El calcio es el metal más abundante en el organismo, representando aproximadamente el 1,5% del peso corporal y aunque es un componente vital para el funcionamiento de todas las células y órganos, entre el 98 y el 99% del calcio está localizado en el tejido óseo. El resto del calcio se encuentra en una gran proporción unido a fosfolípidos de membrana constituyendo el denominado citoesqueleto, que incluye no solo la membrana plasmática de la célula, sino también todas las membranas de las organelas intracelulares. El 45% del calcio extracelular se encuentra ionizado, su regulación depende en primer lugar de: la absorción intestinal, el crecimiento y la reabsorción ósea, y la filtración y reabsorción renal. Secundariamente depende de su cinética a nivel extracelular que está determinada por varios factores como el pH sistémico, la temperatura, la concentración de proteínas e influencias hormonales como la hormona paratiroidea, la calcitonina y el calcitriol.

3.1. Papel del consumo de calcio en la hipertension arterial

A lo largo de esta última década, se han descrito un cúmulo de evidencias que apuntan a la existencia de una relación causal entre el deficiente aporte de calcio en la dieta y la presencia de cifras elevadas de PA¹¹⁷⁻¹²². Esta hipótesis está respaldada por estudios epidemiológicos que han puesto de manifiesto la

relación inversa entre el consumo de calcio y las cifras de PA; por el hallazgo, en humanos y animales de experimentación con HTA primaria, de marcadores biológicos que pueden estar relacionados con una deficiencia de calcio; y por estudios de intervención en los que se ha demostrado la reducción de las cifras de PA con dietas suplementadas en calcio.

3.1.1. Evidencias epidemiológicas

Las primeras observaciones que relacionaban el consumo de calcio y la HTA datan de hace apenas dos décadas y se deben a la descripción de una menor incidencia de enfermedad cardiovascular en las poblaciones con un consumo de aguas más duras¹⁷. Desde entonces, diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo en varios continentes han podido demostrar una relación inversa entre las cifras de PA y el consumo diario de calcio^{19,23,24,120,124,125}. Entre ellos cabe señalar a los dos más importantes por la cuantía de individuos analizados y la estricta metodología empleada. El primero es el *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES-1), realizado en EEUU con más de 10.000 individuos de razas blanca y negra, de ambos sexos y edades comprendidas entre 18 y 74 años. Los resultados de este estudio, publicados por McCarron en 1984¹⁹, permitieron establecer una relación inversa entre el consumo de calcio y la prevalencia de HTA. El segundo, un estudio prospectivo de cuatro años de duración en el que se estudiaron 58.000 enfermeras americanas¹²⁵, corroboró esta asociación y resaltó la necesidad de una ingesta de calcio superior a los 600 mg/día para

conseguir reducir el riesgo de desarrollar HTA durante el periodo de seguimiento.

3.1.2. Marcadores biológicos

La segunda fuente de evidencia parte de observaciones que muestran, en sujetos hipertensos¹¹⁸, una alteración de los iones y de las hormonas que intervienen en el metabolismo del calcio. En efecto, se ha descrito a nivel plasmático: una reducción del fósforo²⁶, una elevación de los niveles de hormona paratiroidea (PTH)¹²⁶ y de 1-25-dihidroxi-vitamina D₃¹²⁷, y un incremento de la excreción urinaria de calcio^{29,128-133}. A nivel celular, el déficit en el metabolismo del calcio se refleja en una elevación de los niveles de calcio libre intracelular^{33,134-141}.

En modelos animales se han observado alteraciones similares. El calcio iónico plasmático es inferior en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) respecto a las normotensas Wistar-Kyoto (WKY)¹⁴²⁻¹⁴⁵, mientras que la PTH está elevada o no se modifica^{143,145}. Asimismo, se objetiva hipercalciuria^{145,146}, descenso de la producción basal y estimulada de vitamina D₃¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ y descenso del AMPc nefrogénico urinario¹⁵¹⁻¹⁵³, alteraciones todas que traducen una respuesta anómala de los órganos diana a la hormona paratiroidea. A nivel celular, las SHR exhiben una depresión en la capacidad de captar calcio por parte de las fracciones microsomales de aorta y también en fracciones más purificadas de sarcoplasma de arteria mesentérica¹⁵⁴⁻¹⁵⁹. Además, la membrana celular de las SHR presenta una hiperpermeabilidad al calcio ya que tanto la concentración basal como la obtenida tras la estimulación por agonistas está aumentada¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Por lo tanto, se ha sugerido que el miocito vascular no es capaz de mantener los niveles normales de calcio intracelular ni de restablecer la concentración de calcio después de la activación celular¹⁶⁴.

3.1.3 Estudios de intervencion

La relación inversa entre el calcio de la dieta y la PA identificada en estudios epidemiológicos sugiere que los suplementos de calcio podrían descender la PA. Se han efectuado numerosos estudios de intervención analizando esta posibilidad con resultados relativamente contradictorios. En sujetos normotensos, la mayoría de estudios^{122,165,166}, aunque no todos¹⁶⁷, coincide en la ausencia de variaciones significativas de las cifras de PA. En pacientes afectados de HTA esencial, si bien algunos autores no objetivan diferencias de PA¹⁶⁸⁻¹⁸⁰, la mayor parte han objetivado una disminución de las cifras tensionales con los suplementos de calcio^{165,167,181-204}. No obstante, parece evidente que este efecto beneficioso no afecta de manera uniforme a la población hipertensa sino que únicamente algunos individuos responden con variaciones significativas de su PA. Entre ellos, se incluyen los negros norteamericanos de ascendencia africana²⁰⁵⁻²⁰⁷, mujeres con hipertensión gestacional¹⁹³⁻¹⁹⁸ o sujetos sensibles a la sal²⁰⁰⁻²⁰².

3.2. El calcio intracelular en la hipertension arterial

La importancia de estudiar la regulación celular del calcio en la HTA está basada, en primer lugar, en el papel fundamental que tiene el Ca^{2+} intracelular en la contractilidad de la fibra muscular lisa vascular y, en segundo lugar, en que un aumento de resistencias periféricas es un factor central en la HTA establecida. La musculatura lisa vascular de los sujetos hipertensos es hiperreactiva a la estimulación por agonistas²⁰⁸. Aunque este aumento de contractilidad se puede atribuir, al menos en parte, a un aumento de la masa de la pared vascular (hipertrofia e hiperplasia vascular) propio de la HTA establecida²⁰⁸, esta hipersensibilidad persiste en el vaso aislado. Todo y que es importante distinguir entre sensibilidad a agonistas y procesos de hipertrofia celular en el estudio de la hiperreactividad vascular de la HTA, es posible que los procesos que regulan la contracción y la hipertrofia musculares involucren señales intracelulares similares²⁰⁹.

Una evidencia de la importancia del Ca^{2+} intracelular en el mantenimiento de resistencias periféricas elevadas es que los antagonistas del calcio tienen poco o nulo efecto hipotensor en sujetos normotensos^{210,211}. Así, mientras que la reducción de la resistencia vascular producida por el verapamilo es mayor en hipertensos que en normotensos, no se detectan diferencias con el nitroprusiato^{212,213}.

Teniendo en cuenta que el Ca^{2+} intracelular es el principal regulador del tono de la fibra muscular lisa vascular, esta hiperrespuesta se puede producir por:

- 1) un aumento de la sensibilidad de la fibra muscular lisa vascular al Ca^{2+} , o
- 2) un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en estas células.

En la HTA se ha encontrado de forma uniforme una exageración de la reactividad vascular y un aumento de las resistencias vasculares periféricas²⁰⁸. Las ratas SHR constituyen un modelo ampliamente utilizado en el estudio de las alteraciones celulares de la HTA esencial en humanos, ya que comparten con éstos un gran número de características similares²¹⁴. En estas ratas, la sensibilidad al Ca^{2+} de arterias contraídas con noradrenalina es superior que en las ratas WKY, tanto antes como después de desarrollarse la hipertensión. Este fenómeno no se observa en las ratas con HTA de origen renal²¹⁵. Esta hipersensibilidad al calcio se puede explicar por un aumento de la sensibilidad de las miofibrillas al Ca^{2+} o por un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular estimulada por el receptor. Existen estudios que indican que la miosina no parece alterada en las SHR²¹⁶ y que las miofibrillas aisladas no tienen una mayor sensibilidad al Ca^{2+} en animales hipertensos²¹⁷, sugiriendo que el defecto estaría más bien en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

El papel de los receptores hormonales de superficie en la hiperrespuesta vascular a agonistas está en discusión. Se ha visto que ni la intensidad ni la afinidad de los receptores α_1 adrenérgicos están alteradas en las arterias de las SHR en comparación con las ratas WKY²¹⁸. Además, las contracciones de arterias de SHR es exagerada tanto en respuesta a la noradrenalina como a la

vasopresina²¹⁹, y la posibilidad de aumentos del número y/o afinidad de dos clases diferentes de receptores en una misma enfermedad parece remota. Sin embargo, Hatton et al²²⁰ demostraron que el calcio ingerido modula de forma específica los receptores α_1 adrenérgicos, ya que el bloqueo de éstos con fentolamina o prazosina elimina la diferencia de PA observada entre los animales que reciben dietas altas o bajas en calcio. El bloqueo de los receptores α_2 , β_1 o β_2 adrenérgicos no conseguía este efecto.

Ya en 1960, Losse et al detectaron un aumento del contenido total de Ca^{2+} intracelular en eritrocitos de enfermos con HTA esencial³⁷. Más tarde, estos resultados fueron corroborados por estudios realizados con microelectrodos de calcio en eritrocitos humanos²²¹ y en fibra muscular lisa de SHR^{222,223}. Posteriormente, diversos grupos^{33,134,135,224-228} han confirmado un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en plaquetas de enfermos afectados de HTA esencial utilizando métodos con marcadores fluorescentes de Ca^{2+} , aunque conviene resaltar que no todos han hallado dichas diferencias, ni en plaquetas^{229,230} ni en otras células circulantes como los monocitos²³¹, neutrófilos²³² o linfocitos²³³ de enfermos con HTA esencial.

Los mecanismos por los cuales se produce un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la HTA no están bien establecidos pero, en teoría, cualquier paso en la regulación fisiológica del Ca^{2+} intracelular, tanto en reposo como en respuesta a un agonista, podría estar alterada. Así, un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular podría ser debido a una entrada exagerada de

Ca^{2+} desde el espacio extracelular²¹³. Una prueba de esto es que cuando se exponen fragmentos de aorta de SHR y de WKY a medios sin Ca^{2+} sólo los de SHR presentan una relajación significativa²³⁴.

Desde que Bond et al²³⁵ demostraron que la fibra muscular lisa se podía contraer de forma repetitiva en respuesta a noradrenalina en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, se ha considerado el Ca^{2+} liberado de los depósitos intracelulares suficiente, y por lo tanto responsable principal de la contracción inducida por la hormona. Algunos grupos han demostrado la existencia de un aumento exagerado de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares en la HTA esencial^{236,237}. Así, en medios sin calcio, fragmentos de arterias de SHR desarrollan una tensión en respuesta a noradrenalina superior a la que producen las de WKY²³⁸. Esto podría ser así porque o bien el contenido de Ca^{2+} de los depósitos sería más grande en las SHR o bien porque en respuesta a un agonista se produciría una mayor cantidad de IP_3 en las SHR.

3.3. Anomalías de la bomba de calcio en la hipertension arterial

3.3.1. Alteraciones de la fijación de calcio por las membranas celulares

En 1979, Postnov et al²³⁹ demostraron una disminución de la fijación del calcio por parte de las membranas eritrocitarias de pacientes afectados de HTA esencial y ratas hipertensas espontáneas. Trabajos posteriores en vesículas constituidas por fragmentos de membrana pusieron de manifiesto que este defecto afectaba

únicamente a la superficie interna de la membrana citoplasmática^{247,248}, conclusión confirmada en otros experimentos²⁴² en los que se utilizaron ionóforos de Ca^{2+} .

Este defecto en la fijación del Ca^{2+} no parece estar limitado a las membranas eritrocitarias. Estudios realizados en ratas hipertensas espontáneas han demostrado las mismas alteraciones en células del músculo liso vascular^{240,243,244}, miocardio^{240,245}, hepatocitos²⁴⁶ y adipocitos²⁴⁷. Dichas alteraciones pueden ser debidas a una disminución del número de lugares de fijación para el calcio o a un descenso de la afinidad para este catión²⁴⁶.

Entre los posibles grupos membranarios de fijación para el calcio cabe considerar a aminoácidos tales como los ácidos glutámico y aspártico, los grupos carboxílicos y los fosfolípidos con carga negativa como el fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina^{248,249}. De hecho, el 20% del calcio membranario se halla unido a dichos fosfolípidos. No obstante, por lo que respecta a la composición lipídica de las membranas eritrocitarias no parecen existir diferencias entre individuos o animales normotensos y pacientes hipertensos esenciales o ratas hipertensas espontáneas, aunque resulta difícil extrapolar estos datos a otros modelos celulares²⁵⁰.

Aparte de los grupos membranarios de fijación para el calcio, el citoplasma celular contiene varias sustancias capaces de unirse a dicho catión. No obstante, la mayoría de ellas se caracteriza por poseer valores de constante de disociación para el calcio del orden de 2 o 3 magnitudes superiores a los posibles cambios

de la concentración de calcio en condiciones fisiológicas. En este contexto, únicamente las proteínas de fijación altamente selectivas, tales como la troponina, parvalbúmina o la calmodulina pueden tener un cierto papel regulador²⁵⁰.

Los estudios realizados hasta el momento no han puesto de manifiesto diferencias en la concentración citoplasmática, propiedades o distribución de la calmodulina entre hipertensos y normotensos²⁵¹, aunque, como se discutirá posteriormente, parece existir un defecto en la estimulación por parte de la calmodulina del transporte de calcio mediado por la ATPasa Ca^{2+} -dependiente²⁵²⁻

²⁵⁴.

El fallo en la demostración de que las propiedades físico-químicas de la membrana celular sean responsables del defecto de fijación del calcio obliga a asumir que la alteración debe residir en el transporte activo de dicho catión. Si tenemos en cuenta que el principal responsable del mantenimiento de la baja concentración de calcio libre citosólico lo constituye la bomba de calcio de la membrana celular y del retículo sarcoplásmico, parece lógico pensar que un defecto en dicho sistema de transporte pueda jugar un papel relevante en la hipertensión arterial primaria.

3.3.2. Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial experimental

Los primeros trabajos que estudiaron el transporte activo de Ca^{2+} fueron

publicados en 1983 por el grupo de Postnov²⁵³ y se efectuaron sobre preparados de membranas eritrocitarias formando vesículas, en las que la superficie interna de la membrana se hallaba expuesta al medio extracelular, las llamadas "inside-out vesicles". En estos experimentos los autores demostraron una disminución del transporte activo de Ca^{2+} estimulado por la calmodulina en las ratas hipertensas espontáneas. Si bien la velocidad de acumulación de calcio en condiciones basales no presentaba diferencias significativas entre las especies de ratas hipertensas y normotensas, la adición de calmodulina al medio extracelular provocaba una estimulación máxima del transporte activo de Ca^{2+} significativamente mayor en las ratas normotensas que en sus homónimas hipertensas. Los autores sugerían que el incremento en el contenido intracelular de calcio observado en la HTA podía ser consecuencia de este déficit de estimulación, bien por un fallo en la interacción de las moléculas de la calmodulina y de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente, bien por una alteración en el medio fosfolipídico de la membrana en el que la bomba se halla inmersa.

La extrapolación de estos resultados a otros modelos celulares fue realizada por los mismos autores al estudiar sinaptosomas cerebrales de ratas hipertensas espontáneas²⁵⁴ y por otros, al estudiar membranas de células miocárdicas de la misma especie²⁵⁵. No obstante, en este último trabajo se pudo observar que la actividad basal de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en membranas desprovistas de calmodulina era mayor en las ratas hipertensas que en las normotensas.

Otros modelos de animal de experimentación con HTA de origen genético

parecen poseer las mismas características por lo que respecta al transporte de Ca^{2+} . Así, Vezzoli et al²⁵⁶ publicaron un trabajo en 1985 en el que se estudiaba el transporte activo de Ca^{2+} en preparados de membranas eritrocitarias de ratas hipertensas de la cepa de Milan. Esta estirpe de animales se caracteriza por desarrollar HTA de forma genética aunque difiere de las ratas hipertensas espontáneas clásicas en el funcionamiento de sus sistemas de transporte y en su homeostasis iónica. Así, las ratas hipertensas espontáneas clásicas presentan una inhibición del Cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ y una tendencia a incrementar el contenido intracelular de Na^+ cuando son sometidas a una sobrecarga salina³⁶. Este incremento del Na^+ intracelular podría condicionar, en otras células diferentes a los eritrocitos, una disminución del transporte de Ca^{2+} y un aumento del Ca^{2+} libre citosólico a través de una inhibición del Contratransporte $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$

257

Sin embargo, las ratas hipertensas milanesas poseen un Cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ hiperactivo y una disminución del Na^+ intracelular²⁵⁸ por lo que no podría aducirse este mecanismo para la inhibición del transporte de Ca^{2+} . En el grupo de ratas hipertensas milanesas estudiadas por Vezzoli et al²⁵⁶ la actividad basal de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en ausencia de calmodulina se encontró ligeramente aumentada, si bien las diferencias con las ratas normotensas no eran estadísticamente significativas. Por el contrario, la adición al medio extracelular de calmodulina estimulaba de forma significativamente superior el transporte activo de Ca^{2+} en las ratas normotensas. El análisis cinético de dicho transporte

mostraba una reducción del 30% en la rata hipertensa milanesa por lo que respecta a la velocidad máxima, sin diferencias en la afinidad para el calcio entre ambas especies. Similares resultados fueron referidos posteriormente por Cirillo et al²⁵⁹ en el mismo modelo experimental, así como por otros autores estudiando el músculo liso de las ratas Dahl sal-sensibles en condiciones de sobrecarga salina²⁶⁰.

Una de las principales críticas que se pueden aducir a estos trabajos es la utilización de preparados de membrana en un medio artificial. Si bien los estudios realizados hasta el momento muestran resultados prácticamente superponibles, no es menos cierto que las condiciones metodológicas empleadas reflejan escasamente la fisiología celular²⁶¹. Teóricamente, las condiciones idóneas para la medida de la actividad de la bomba de calcio deberían realizarse en células intactas. Por lo que respecta a la medida de esta actividad en la hipertensión experimental caben destacar dos trabajos publicados hasta el momento.

Dagher et al²⁶², desarrollaron en 1987 una nueva metodología para el estudio de las propiedades cinéticas de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en hematíes intactos. Los hematíes eran expuestos a la presencia del ionóforo A23187, capaz de aumentar la permeabilidad pasiva de la membrana celular para los cationes divalentes y promover una acumulación intracelular de Ca^{2+} . La adición al medio de cloruro de cobalto bloquea de manera inmediata todos los movimientos de calcio a través del ionóforo A23187, sin afectar la extrusión activa de calcio a través de la bomba. La aplicación de dicha metodología al estudio de la

hipertensión experimental no fue capaz de poner de manifiesto diferencias significativas en la afinidad para el calcio o en la velocidad máxima de transporte en las ratas hipertensas espontáneas.

Finalmente, Orlov et al²⁶³, utilizando una tecnología diferente, en la que los eritrocitos son cargados con el quelante de calcio Quin-2 y la ATPasa bloqueada por la adición de Na_3VO_4 , no consiguieron demostrar diferencias significativas en la actividad basal de la bomba de calcio en dos tipos de ratas con hipertensión genética, las ratas hipertensas espontáneas y las ratas hipertensas milanesas. Asimismo, la adición de R24571, un inhibidor de las acciones mediadas por la calmodulina, no provocaba diferencias en la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo que dichos autores concluían que, al contrario de lo que sucedía en los preparados de membrana, la calmodulina no jugaba un papel significativo en el transporte de calcio en las células intactas. Por otra parte, estos mismos autores sugerían que el aumento del calcio intracelular en la hipertensión arterial podría ser debido a un incremento en el influjo pasivo de este ion. A conclusiones parecidas llegaban Oshima et al²⁶⁴ al estudiar plaquetas de ratas con HTA primaria.

En resumen, de los estudios llevados a cabo en la hipertensión experimental puede deducirse que, si bien parece existir un defecto en la interacción entre la calmodulina y la bomba de calcio que condiciona una disminución de la extrusión de este catión cuando se utilizan preparados de membrana plasmática, este defecto no se reproduce al estudiar células intactas, donde el papel que juega la

calmodulina en la activación de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente no está bien definido.

3.3.3. Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertension arterial esencial

La investigación de la actividad de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en la HTA esencial ha corrido pareja a la de la HTA experimental. La diferencia básica es que prácticamente todos los trabajos se han realizado en células circulantes, por razones obvias.

Nuevamente fue el grupo de Postnov^{251,254} quien demostró una disminución del transporte activo de Ca^{2+} estimulado por la calmodulina en membranas eritrocitarias de pacientes afectados de HTA esencial. Los resultados obtenidos fueron superponibles a los hallados en las ratas hipertensas espontáneas. En preparados de membrana sometidos a depleción de calmodulina no se observaron diferencias en el transporte activo de calcio, ni en la afinidad de la ATPasa para el Ca^{2+} ni en la velocidad máxima de transporte. Por el contrario, la adición de calmodulina (2 $\mu\text{g/ml}$), independientemente de su origen, provocaba un aumento tanto de la afinidad para el Ca^{2+} como de la velocidad máxima, que era claramente superior en los individuos normotensos respecto a los hipertensos esenciales. Mientras que en los pacientes afectados de HTA esencial la adición de calmodulina duplicaba la velocidad máxima de transporte y triplicaba la afinidad

para el Ca^{2+} , ambos parámetros se multiplicaban por 5 en los preparados de membranas eritrocitarias de los individuos normotensos. La conclusión final fue que debía existir un defecto en la interacción de la calmodulina con la bomba de calcio de las membranas eritrocitarias. La extrapolación de este defecto a otros modelos celulares presuntamente implicados en la HTA esencial venía dada por los resultados obtenidos en ratas hipertensas espontáneas, ya discutidos previamente.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente por otros autores. Así, Olorunsogo et al²⁶⁵ corroboraban que los eritrocitos de los pacientes hipertensos esenciales presentaban una estimulación del transporte activo de Ca^{2+} que representaba el 50% de la obtenida en los individuos normotensos. Igualmente, Resinck et al²⁶⁶, al estudiar plaquetas de pacientes con HTA esencial encontraron una disminución de la estimulación del transporte de Ca^{2+} por la calmodulina, si bien la actividad basal de la ATPasa se encontraba aumentada en estos pacientes.

Contrariamente a estos resultados, Vincenzi et al²⁶⁷, al estudiar un grupo de 36 hipertensos esenciales, detectaron una disminución de la actividad basal de la ATPasa asumida como la actividad resistente a la inhibición por la trifluoperazina, conocido inhibidor de las acciones de la calmodulina²⁶⁸. Por contra, en ausencia de dicho inhibidor y asumiendo que estas condiciones representaban la actividad máxima de la ATPasa, no se encontraron diferencias entre normotensos e hipertensos.

En un trabajo ya comentado anteriormente, Dagher et al²⁶², en el primer estudio utilizando el hematíe intacto de ratas hipertensas espontáneas y pacientes hipertensos esenciales, concluían que no existían alteraciones evidentes ni en la velocidad máxima de transporte ni en la afinidad para el Ca^{2+} de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente eritrocitaria en la HTA esencial. Un análisis más detallado de estos resultados revelaba, no obstante, pequeñas diferencias en el sentido de una tendencia por parte de los pacientes afectos de HTA esencial a presentar valores de afinidad para el Ca^{2+} intracelular inferiores a la población normotensa. De hecho, los propios autores reflejaban en la discusión de sus resultados la posibilidad de que un pequeño subgrupo de pacientes sí presentaran alteraciones en la ATPasa Ca^{2+} -dependiente.

De la Sierra et al³, ha demostrado en un pequeño grupo de pacientes unas diferencias significativas en los parámetros cinéticos de la bomba de calcio eritrocitaria entre hipertensos y normotensos, lo que parece confirmar las observaciones de Dagher et al²⁶² en el sentido de que la HTA primaria como entidad única no se asocia a una anomalía de la bomba de calcio eritrocitaria, aunque sí podrían existir subgrupos con alteraciones a dicho nivel.

III. Hipótesis y objetivos

En la revisión bibliográfica se han expuesto las evidencias que relacionan el calcio con la hipertensión arterial esencial, relación basada en consideraciones epidemiológicas, experimentales y clínicas, que tienden a tener un denominador común, promover un incremento del calcio libre citosólico, responsable del aumento de tono vascular y por lo tanto, de las resistencias periféricas, con la consiguiente perpetuación de cifras elevadas de presión arterial.

Dado que los movimientos del Ca^{2+} a través de la membrana celular, y, por tanto, el contenido de Ca^{2+} intracelular, están mediados en parte por la bomba de Ca^{2+} parece lógico pensar en la posibilidad de que una alteración en la bomba de Ca^{2+} pudiera ser la causa que explicará el aumento de la concentración intracelular de calcio que parece estar presente en los pacientes afectados de HTA esencial. Si bien es posible que esta anomalía no esté presente en todos los hipertensos, la presencia de esta alteración de la bomba de Ca^{2+} en un grupo de estos pacientes apoyaría la heterogeneidad en la etiopatogenia de la HTA esencial. Asimismo, es posible que este grupo de pacientes hipertensos con alteraciones en la bomba de Ca^{2+} pueda tener características clínico-biológicas distintas, lo que podría tener diferentes implicaciones, desde definitorias sindromicamente hasta terapéuticas.

Hipótesis

Para verificar esta hipótesis de trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar la existencia de posibles anomalías de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente eritrocitaria en los pacientes afectados de HTA esencial y cuantificar su prevalencia.
2. Clasificar a los pacientes afectados de HTA esencial basándose en la existencia de anomalías en la ATPasa Ca^{2+} -dependiente eritrocitaria.
3. Determinar las características clínicas, bioquímicas y hormonales asociadas a las anomalías de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente.

IV. Material y métodos

1. Selección de pacientes

Se ha estudiado un total de 76 individuos de los que 27 constituyen el grupo control y 49 el grupo de hipertensos esenciales.

Basándose en los criterios de clasificación establecidos por el Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure²⁶⁹, la hipertensión arterial se ha definido como una presión arterial sistólica igual o superior a 140 mm de Hg y, además, o independientemente, una presión arterial diastólica superior o igual a 90 mm de Hg, en al menos 3 determinaciones separadas durante 1 mes.

1.1. Grupo control

El grupo control está constituido por 27 individuos de ambos sexos, sanos, normotensos, sin antecedentes familiares de HTA en, al menos, dos generaciones. Ninguno de ellos estaba sometido a tratamiento médico y ninguna de las mujeres estaba embarazada o tomaba anticonceptivos hormonales en el momento de realizar el estudio.

1.2. Grupo de pacientes con hipertensión arterial esencial

El grupo de hipertensos esenciales está constituido por 49 pacientes procedentes de la Unidad de HTA del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. El

diagnóstico de HTA esencial se estableció tras haber realizado un completo examen clínico, biológico y radiológico que excluía razonablemente la existencia de una causa secundaria de HTA. Todos los pacientes fueron informados de la finalidad del estudio y dieron su consentimiento por escrito, suspendiendo cualquier tratamiento antihipertensivo que eventualmente siguieran durante el mes previo a la extracción sanguínea.

2. Metodologías

2.1. Medida de la presión arterial

La PA se ha determinado mediante el método recomendado por la Organización Mundial de la Salud, utilizando un esfigmomanómetro de mercurio con un brazal de 12 ó 15 cm de anchura, en función del perímetro del brazo del paciente. Con el paciente en decúbito supino, tras 5 minutos de reposo y con el estetoscopio situado en la fosa antecubital del codo correspondiente, se insufla rápidamente el brazal hasta alcanzar una presión a la que ya no se aprecia el pulso radial. A continuación se desinfla paulatinamente el brazal a una velocidad uniforme de 2 a 3 mm de Hg por segundo. Se toma como PAS aquélla en la que el oído distingue el primer sonido arterial (fase I de Korotkoff) y como PAD el punto en que desaparece el último sonido arterial (fase V de Korotkoff). A los 5 minutos y con el paciente todavía en decúbito, se repite la determinación de PA, tomándose como cifra tensional la media entre las dos determinaciones. La presión arterial

media (PAM) se ha calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{PAM} = (\text{PAS} - \text{PAD})/3 + \text{PAD}$$

2.2. Metodología del análisis bioquímico y hormonal

Para el estudio bioquímico se realizó por medio del autoanalizador Technicon Dax-72, utilizando las metodologías estandarizadas: método de la hexoquinasa para la glucosa, método de Trinder para los lípidos, y el método Jaffé's para la creatinina.

La actividad renina plasmática, la aldosterona, la adrenalina, la noradrenalina y el factor natriurético atrial fueron medidos utilizando los kits comerciales habituales²⁷⁰.

2.3. Metodología del ecocardiograma

Se practicó a todos los pacientes un ecocardiograma bidimensional en modo M, tras permanecer al menos 10 minutos en decubito lateral izquierdo. Todos los trazados ecoardiográficos fueron interpretados por dos especialistas entrenados. De acuerdo con los criterios de la American Society of Echocardiography²⁷¹, se obtuvieron los siguientes parámetros relativos al ventrículo izquierdo, siendo cada uno de ellos la media de al menos tres

mediciones:

- a) Diametro telediastólico.
- b) Diametro telesistólico.
- c) Grosor de la pared posterior en diastole.
- d) Grosor del septo interventricular.

La masa ventricular izquierda se calculó siguiendo los criterios de las convenciones de Penn²⁷² y dividiendo por la superficie corporal se calculó el indice de masa ventricular izquierda, expresandose el resultado en gramos por metro cuadrado. Se consideró hipertrofia ventricular izquierda si el indice de masa ventricular izquierda era superior a 110 g/m² en la mujer y 130 g/m² en el hombre.

2.4. Determinación de los parámetros cinéticos de la ATPasa Ca²⁺ dependiente.

Para el estudio de la actividad de ATPasa Ca²⁺ dependiente a nivel de la membrana celular se ha elegido el hematíe por su fácil obtención y manipulación. Así mismo, se ha utilizado el Sr²⁺ como análogo del Ca²⁺, dada la dificultad de medir en condiciones estables el flujo de Ca²⁺ por su baja concentración libre y su rapidez en el flujo de salida, teniendo en cambio el Sr²⁺ un transporte más lento y de menor afinidad, lo que permite a su vez utilizar más altas concentraciones.

2.4.1. Preparación de los eritrocitos

Se extraen 20 ml de sangre venosa en tubos con heparina. Se centrifugan a 1750 g durante 10 minutos a 4°C y se aspira el plasma y la capa de leucocitos. Los eritrocitos se lavan dos veces en una solución de NaCl 150 mM.

2.4.2. Procedimiento de carga

Se preparan 8 alícuotas de hematíes que van a contener distintas concentraciones intracelulares de Sr^{2+} y de Ca^{2+} . Las primeras 4 alícuotas contendrán concentraciones crecientes de Sr^{2+} , mientras que el Ca^{2+} se mantendrá a un nivel fisiológico. Las 4 siguientes presentarán una concentración fija de Sr^{2+} , similar a la máxima obtenida en las anteriores y concentraciones crecientes de Ca^{2+} . Para conseguir este objetivo, los hematíes se resuspenden a un hematocrito final del 10% en un medio de Na^+ - K^+ , que contiene (en mmol/l) NaCl 75, KCl 75, MOPS (ácido 4-morfolinopropanosulfónico)-Tris 10, Glucosa 10, MgCl_2 0,2. En cada uno de los tubos de incubación se añaden diferentes concentraciones de Sr^{2+} y, a los 4 últimos, concentraciones crecientes de Ca^{2+} . Para conseguir la entrada de los cationes divalentes al interior celular se utiliza el ionóforo A-23187 a una concentración final de 6 μM . Los eritrocitos se incuban en estos medios a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, y con el objeto de extraer el ionóforo de las membranas se procede a 4 lavados sucesivos a 37°C con las mismas soluciones, pero donde el ionóforo A-23187 se sustituye por

albúmina bovina a una concentración final de 10 gr/L. A los dos últimos lavados se añade Inosina 5mM, Adenina 2mM y tampón fosfato 5mM con el objeto de restablecer el nivel fisiológico de ATP. Una vez finalizado este periodo, se procede al lavado por triplicado con NaCl 75 mM y KCl 75mM, resuspendiéndose los hematíes en esta misma solución hasta alcanzar un hematocrito de aproximadamente el 30%. Para cada suspensión se determina el hematocrito (Hto. inicial) por capilar microhematocrito (duplicado) y la absorbencia de la hemoglobina (Ab. Hb. inicial) por colorimetría a 540,5 nm.

2.4.3. Determinación de Sr^{2+} y Ca^{2+} intraeritrocitarios

Se obtienen 200 μ l de cada una de las suspensiones eritrocitarias en la solución antes mencionada y se procede a su lisis con 4 ml de agua bidestilada. Los restos de membranas se eliminan mediante centrifugación a 4500 g durante 9 minutos. La determinación de Sr^{2+} y Ca^{2+} intraeritrocitarios se realiza en un espectrofotómetro de absorción atómica. El resultado final se expresa en milimoles por litro de células (mmol/l.cel).

2.4.4. Determinación del flujo de Sr^{2+}

Los hematíes se resuspenden hasta alcanzar un hematocrito final de aproximadamente 6% en un medio de incubación constituido por:

- NaCl 75 mM
- KCl 75 mM

Material y métodos

- MOPS-Tris 10 mM (pH: 7,4 a 37°C)
- Glucosa 10 mM
- MgCl₂ 1 mM

Procediéndose a su incubación durante 15 minutos a 37°C (en experimentos control se ha observado que el flujo de salida de Sr²⁺ es lineal hasta dicho tiempo). Al finalizar el periodo de incubación, se enfrían los tubos por inmersión en hielo durante 2 minutos, se centrifugan a 1750 g durante 4 minutos y se recoge el sobrenadante para la determinación del Sr²⁺ por espectrofotometría de absorción atómica. El flujo de salida de Sr²⁺ se cuantifica según la ecuación:

$$Fl.salidaSr^{2+} = \frac{(DSr) \times (1 - Hto.final)}{t \times Hto.final} \quad (1)$$

donde *t* corresponde al tiempo de incubación, medido en horas y DSr (en μmol/litro de sobrenadante) es la diferencia entre la concentración extracelular de Sr²⁺ entre el tiempo 0 y al final de la incubación a 37°C. El resultado final se expresa en μmol por litro de células por hora (μmol.(l cel.h)⁻¹).

2.4.5. Cálculo de la afinidad aparente de la ATPasa Ca²⁺-dependiente para el Sr²⁺ intracelular y de la velocidad máxima de la salida de Sr²⁺

En cada experimento realizado, el flujo de salida de Sr²⁺ se expresa en función de la concentración intracelular de dicho ion, lo que permite calcular la curva de

estimulación del sistema en función del sustrato utilizado, en este caso el Sr^{2+} .

Dicha curva es sigmoidea (figura 2, izquierda) y puede definirse por la ecuación:

$$V = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{Sr}}{Sr_i}\right)^2} \quad (2)$$

donde V_{\max} representa la velocidad máxima de la salida de Sr^{2+} , K_{Sr} es la constante de disociación aparente para el Sr^{2+} intracelular (Sr_i) y 2 es el número de lugares de fijación interna de la ATPasa para el Sr^{2+} . Utilizando modificaciones matemáticas dicha ecuación puede convertirse en:

$$\frac{1}{V} = \frac{\left(1 + \frac{K_{Sr}}{Sr_i}\right)^2}{V_{\max}} \quad (3)$$

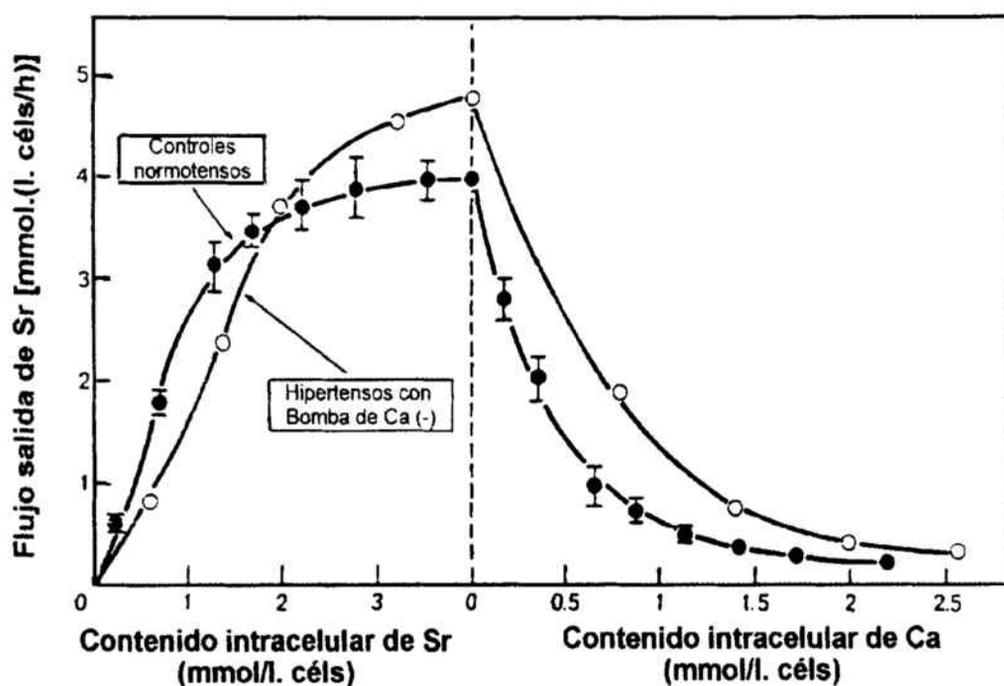
$$\frac{1}{V^{1/2}} = \frac{1}{V_{\max}^{1/2}} + \frac{K_{Sr}}{V_{\max}^{1/2} \times Sr_i} \quad (4)$$

y multiplicando ambos factores por Sr_i :

$$\frac{Sr_i}{V^{1/2}} = \frac{Sr_i}{V_{\max}^{1/2}} + \frac{K_{Sr}}{V_{\max}^{1/2}} \quad (5)$$

Material y métodos

así, el primer factor puede expresarse como una función lineal del estroncio intracelular y puede representarse mediante un gráfico de Hanes, de tal manera que la velocidad máxima puede calcularse por regresión lineal a partir de la pendiente de la recta y la constante de disociación aparente a partir de su intersección con la abscisa.



Es importante hacer notar que para una concentración final de Sr^{2+} intraeritrocitario de 3-4 mmol/l.cels el flujo de Sr^{2+} representa el 70-90% de la V_{max} . Por esta razón y con el objeto de simplificar, la V_{max} se calcula en todos los casos por extrapolación de los datos de acuerdo con la ecuación (2).

2.1.6. Cálculo de la afinidad aparente para el Ca^{2+} intracelular

Para cada sujeto estudiado, el flujo de Sr^{2+} (a concentración constante y la máxima alcanzada) se calcula en función de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Figura 2, derecha). Concentraciones crecientes de este último inhiben el flujo de Sr^{2+} de acuerdo con la ecuación:

$$V = \frac{V_{\max}}{\left(\left(1 + \frac{K_{\text{Sr}}}{\text{Sr}_i} \right) \times \left(1 + \frac{\text{Ca}_i}{K_{\text{Ca}}} \right) \right)^2} \quad (6)$$

donde K_{Ca} representa la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular (Ca_i).

Teniendo en cuenta que el Sr_i es constante, la ecuación (6) puede modificarse como sigue:

$$V = \frac{V_{\max}^*}{\left(1 + \frac{\text{Ca}_i}{K_{\text{Ca}}} \right)^2} \quad (7)$$

donde

$$V_{\max}^* = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_{\text{Sr}}}{\text{Sr}_i} \right)^2} \quad (8)$$

y

$$K_{Ca}^* = K_{Ca} \left(1 + \frac{Sr_i}{K_{Sr}} \right)^2 \quad (9)$$

Utilizando modificaciones matemáticas como en el apartado anterior la ecuación (7) puede representarse de la siguiente manera:

$$V^{-1/2} = (V_{max}^*)^{-1/2} + \left(\frac{Ca_i}{K_{Ca}^*} \right) (V_{max}^*)^{-1/2} \quad (10)$$

así, el primer miembro de la ecuación puede expresarse como una función lineal del calcio intracelular y representarse mediante un gráfico de Hanes, obteniéndose K_{Ca} a partir de la intersección de la recta con la abscisa.

3. Análisis estadístico

3.1. Pruebas estadísticas utilizadas

Las pruebas estadísticas utilizadas en esta tesis doctoral han sido:

1. Estadística univariante

- 1.a. Medidas de tendencia central: Media aritmética (\bar{x}).
- 1.b. Medidas de dispersión: desviación estándar (DE), error estándar de la media (EEM)

2. Estadística inferencial

- 2.a. Verificación de la hipótesis de normalidad de las muestras: Prueba de Shapiro-Francia.
- 2.b. Intervalo de confianza.
- 2.c. Comparación entre 2 grupos: prueba de la t de Student-Fisher para datos independientes y prueba de la U de Mann-Whitney.

- 2.d. Relación entre 2 variables cuantitativas: coeficiente de correlación lineal de Pearson.

3.2. Soporte informático

Los datos recogidos de cada uno de los individuos estudiados se han codificado numéricamente, y posteriormente se han introducido en una base de datos "dBase 5 para Windows" diseñada para este fin. Para los cálculos estadísticos se ha utilizado el paquete estadístico Biomedical Package Statistical Software²⁷³ (BMDP) con las siguiente subrutinas:

1. Media, desviación estándar y error estándar de la media, prueba de normalidad: Subrutina 2D.
2. Prueba de la t de Student: Subrutina 3D.
3. Correlación lineal: Subrutina 6D.
4. Prueba de la U de Mann-Whitney: Subrutina 3S.

V. Resultados

1. Características generales de la serie

1.1. Grupo Control

1.1.1. Descripción de los parámetros

El grupo control estaba constituido por 27 individuos sanos (19 varones y 8 mujeres) con una edad media de 41.4 ± 7.8 años (media \pm desviación estándar), con límites comprendidos entre 28 y 56 años. La talla media era de 170.9 ± 9.4 cm y el peso de 71 ± 15.2 kg.

Los valores medios de presión arterial fueron: PAS 124.3 ± 6.2 mmHg y PAD 78.6 ± 5.3 mmHg. Los valores medios de los parámetros bioquímicos y ecocardiográficos analizados se describen en Tabla 1.

Los valores medios de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} (V_{max}) fueron 5.2 ± 1.6 milimoles por Litro de células y por hora (mmol/L.cels/h) (tabla 2). La distribución individual de dichos valores se representa en la Figura 3. Los valores medios de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total (K_{ca}) fueron 55.25 ± 15.13 micromoles por litro de célula ($\mu\text{mol/L.cels}$) (tabla 2). La distribución individual de dichos valores se representa en la Figura 4.

Tabla 1

Valores medios (\pm DE) de los parámetros clínicos, bioquímicos y ecocardiograficos básicos en los 27 individuos que constituyen el grupo control

| Parámetro | Media | Desviación |
|--|--------------|-------------------|
| Edad (años) | 41.4 | 7.8 |
| Talla (cm) | 170.9 | 9.4 |
| Peso (Kg) | 71 | 15.2 |
| Indice de masa corporal (Kg/m ²) | 24.03 | 3.27 |
| PAS (mmHg) | 124.3 | 6.2 |
| PAD (mmHg) | 78.6 | 5.3 |
| Presión arterial media (mmHg) | 93.88 | 5.31 |
| Frecuencia cardíaca (latidos por min.) | 72.5 | 4.8 |
| Glicemia (mg/dl) | 86.8 | 8 |
| Creatinina (mg/dl) | 0.78 | 0.17 |
| Aclaramiento creatinina (ml/min) | 126.18 | 62.4 |
| Ac. úrico (mg/dl) | 3.91 | 1.24 |
| Colesterol (mg/dl) | 184.51 | 38.73 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 89.66 | 23.69 |
| Diámetro telediastólico (mm) | 50.77 | 3.6 |
| Grosor pared posterior (mm) | 8.51 | 1.3 |
| Masa ventricular izquierda (g) | 175.62 | 53.1 |
| Indice masa ventricular (g/m ²) | 94.26 | 19.16 |

Tabla 2

Valores medios (\pm DE) de los parámetros cinéticos de la bomba de calcio en los 27 individuos que constituyen el grupo control

| Parámetro | Media | Desviación |
|------------------------------|--------------|-------------------|
| V_{\max} (mmol/L.cels/h) | 5.2 | 1.6 |
| K_{ca} (μ mol/L.cels) | 55.25 | 15.13 |

Figura 3. Histograma que muestra la distribución en frecuencias de los valores individuales de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los 27 individuos que constituyen el grupo control.

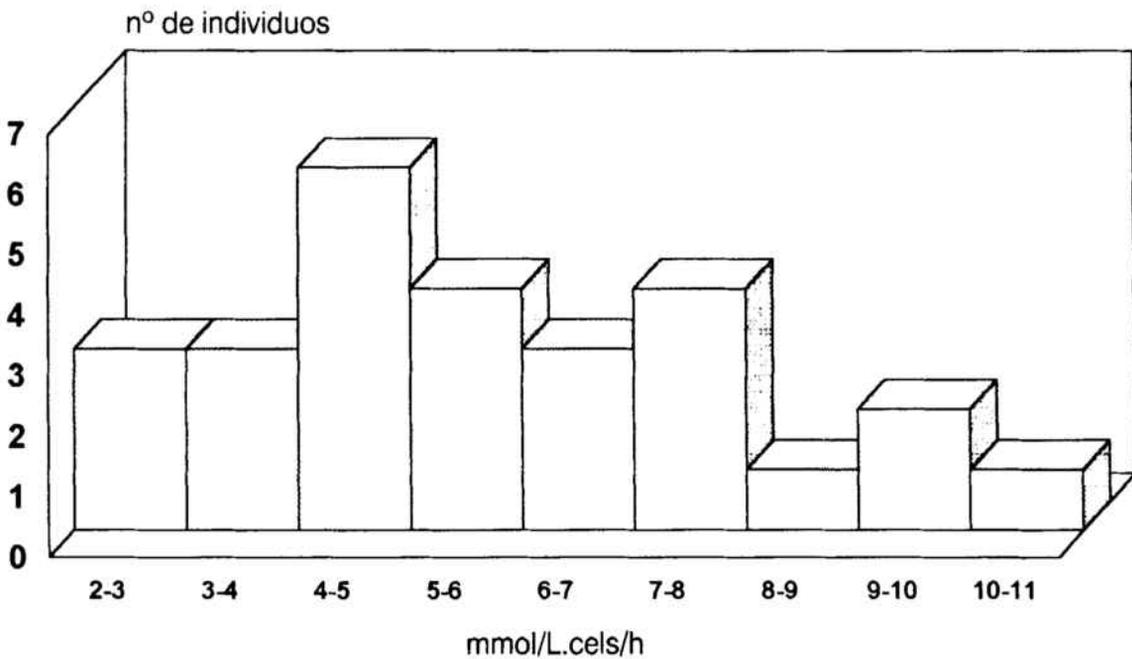
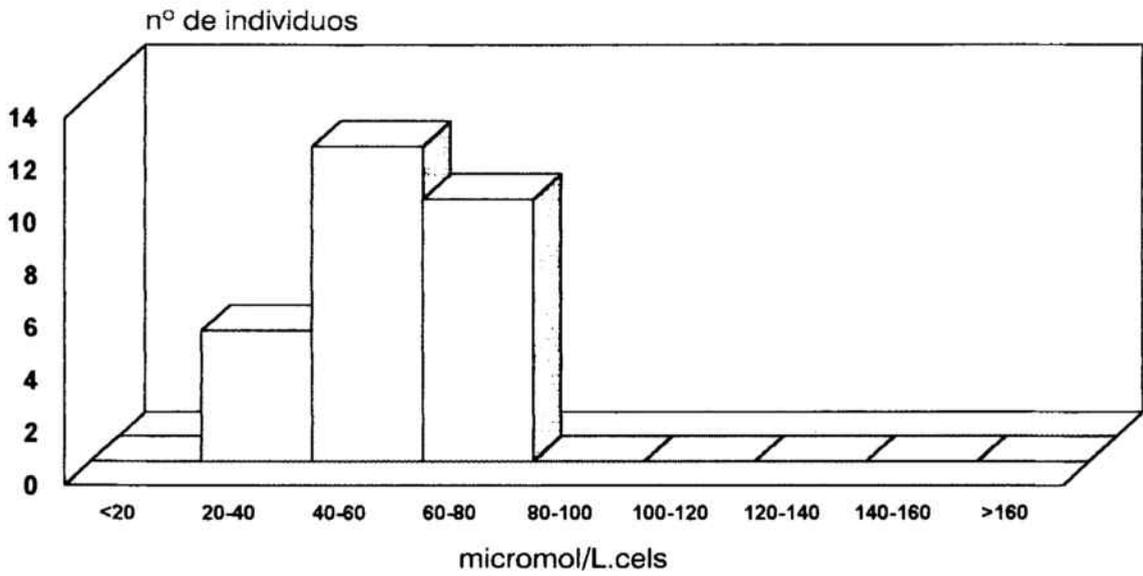


Figura 4. Histograma que muestra la distribución en frecuencias de los valores individuales de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en los 27 individuos que constituyen el grupo control.



1.2. Grupo de pacientes con Hipertensión Arterial esencial

1.2.1. Descripción de los parámetros

El grupo de pacientes hipertensos esenciales estaba constituido por 49 individuos (37 varones y 12 mujeres) con una edad media de 45.3 ± 11.4 años (media \pm desviación estándar), con límites comprendidos entre 22 y 76 años. La talla media era de 166.4 ± 9.6 cm y el peso de 76.2 ± 12.2 kg. Los valores medios de presión arterial fueron: PAS 170.89 ± 14.44 mmHg y PAD 102.89 ± 6.49 mmHg. Los valores medios de los parámetros bioquímicos, hormonales y ecocardiograficos analizados se describen en Tabla 3.

Los valores medios de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} (V_{max}) fueron 6.6 ± 2.3 milimoles por Litro de células y por hora (mmol/L.cels/h) (tabla 4). La distribución individual de dichos valores se representa en la Figura 5. Los valores medios de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total (K_{ca}) fueron 80.36 ± 53.46 micromoles por litro de célula ($\mu\text{mol/L.cels}$) (tabla 4). La distribución individual de dichos valores se representa en la Figura 6.

Tabla 3

Valores medios (\pm DE) de los parámetros clínicos, bioquímicos, hormonales y ecocardiograficos básicos en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales

| Parámetro | Media | Desviación estándar |
|--|--------------|----------------------------|
| Edad (años) | 45.3 | 11.4 |
| Talla (cm) | 166.4 | 9.6 |
| Peso (Kg) | 76.2 | 12.2 |
| Indice de masa corporal (Kg/m ²) | 27.53 | 3.8 |
| PAS (mmHg) | 170.9 | 14.4 |
| PAD (mmHg) | 102.9 | 6.5 |
| Presión arterial media (mmHg) | 125.56 | 8.42 |
| Frecuencia cardíaca (latidos min.) | 80.3 | 5.4 |
| Glicemia (mg/dl) | 105.1 | 42.6 |
| Creatinina (mg/dl) | 1 | 0.19 |
| Aclaramiento creatinina (ml/min) | 95.59 | 27.45 |
| Ac. úrico (mg/dl) | 6.21 | 2.48 |
| Colesterol (mg/dl) | 209.31 | 45.53 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 115.24 | 63.85 |
| Colesterol HDL (mg/dl) | 50.8 | 10.9 |
| Colesterol LDL (mg/dl) | 136.33 | 40.16 |
| Renina basal [ng(ml.h) ⁻¹] | 0.47 | 0.34 |
| Renina estimulada [ng(ml.h) ⁻¹] | 2.26 | 2.26 |
| Aldosterona (ng/ml) | 18.93 | 12.35 |
| Noradrenalina (pg/ml) | 205.93 | 92.47 |
| Factor natriuretico atrial (fmol/ml) | 13.91 | 6.28 |
| Diámetro telediastólico (mm) | 51.88 | 4.85 |
| Grosor pared posterior (mm) | 10.56 | 1.79 |
| Masa ventricular izquierda (g) | 260.8 | 76.6 |
| Indice masa ventricular (g/m ²) | 138.79 | 38.51 |

Tabla 4

Valores medios (\pm DE) de los parámetros cinéticos de la bomba de calcio en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales

| Parámetro | Media | Desviación |
|------------------------------|-------|------------|
| V_{\max} (mmol/L.cels/h) | 6.6 | 2.3 |
| K_{ca} (μ mol/L.cels) | 80.36 | 53.46 |

Figura 5. Histograma que muestra la distribución en frecuencias de los valores individuales de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales.

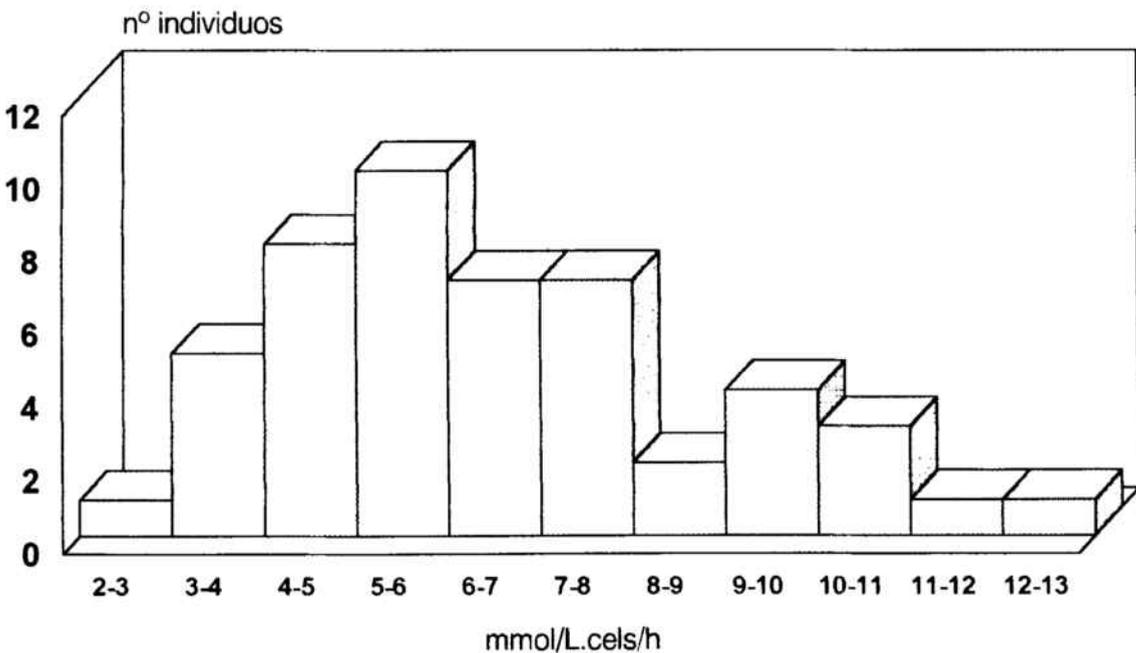
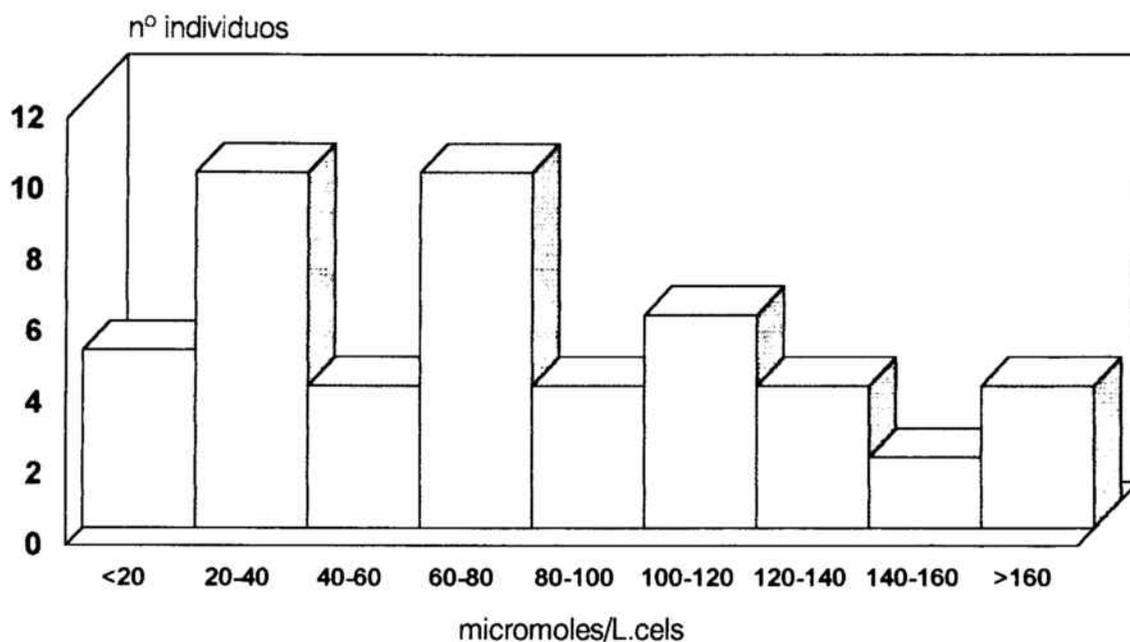


Figura 6. Histograma que muestra la distribución en frecuencias de los valores individuales de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en los 49 individuos que constituyen el grupo de pacientes hipertensos esenciales.



2. Diferencias entre los parámetros cinéticos obtenidos en el grupo control y en los pacientes con HTA esencial.

El grupo de pacientes hipertensos esenciales mostró unos valores medios de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} significativamente superiores a los observados en los individuos del grupo control (6.6 ± 2.3 vs 5.2 ± 1.6 mmol/L.cels/h; $p=0.0067$) (Figura 7)

Al analizar los valores medios de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total (K_{ca}) ésta se encontró ligeramente mayor en el grupo de hipertensos esenciales respecto al grupo control, aunque esta diferencia no llegó a alcanzar una significación estadística (80.36 ± 53.46 vs 55.25 ± 15.13 μ mol/L.cels; $p=0.066$) (Figura 8)

Figura 7. Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los 49 hipertensos esenciales y los 27 controles.

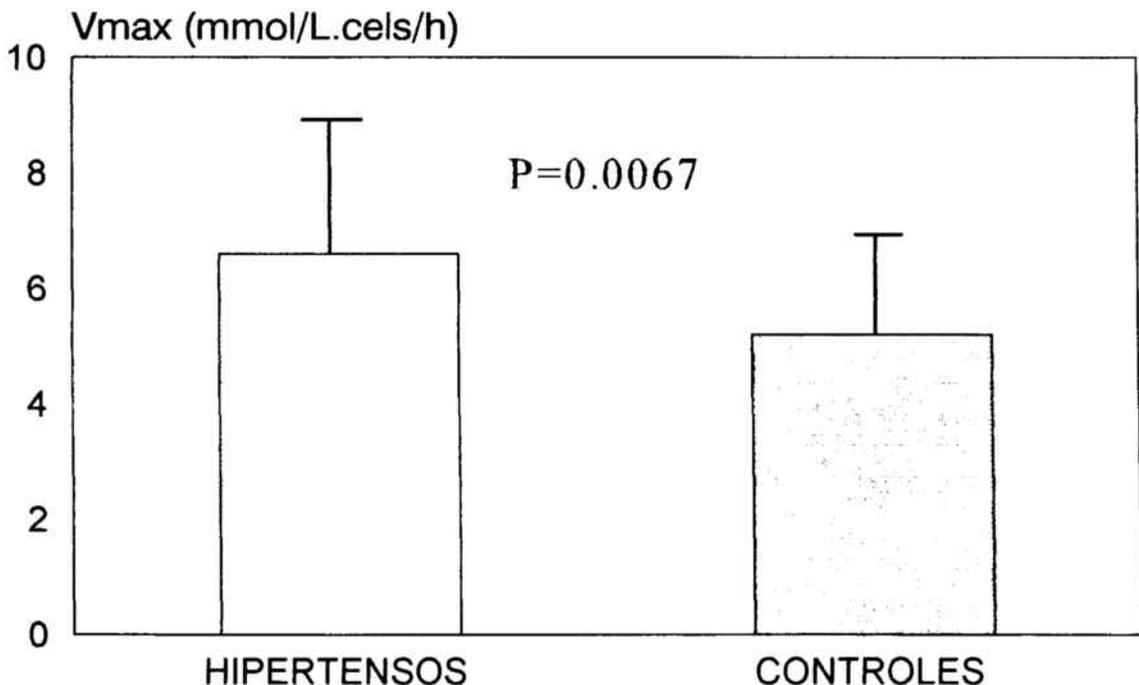
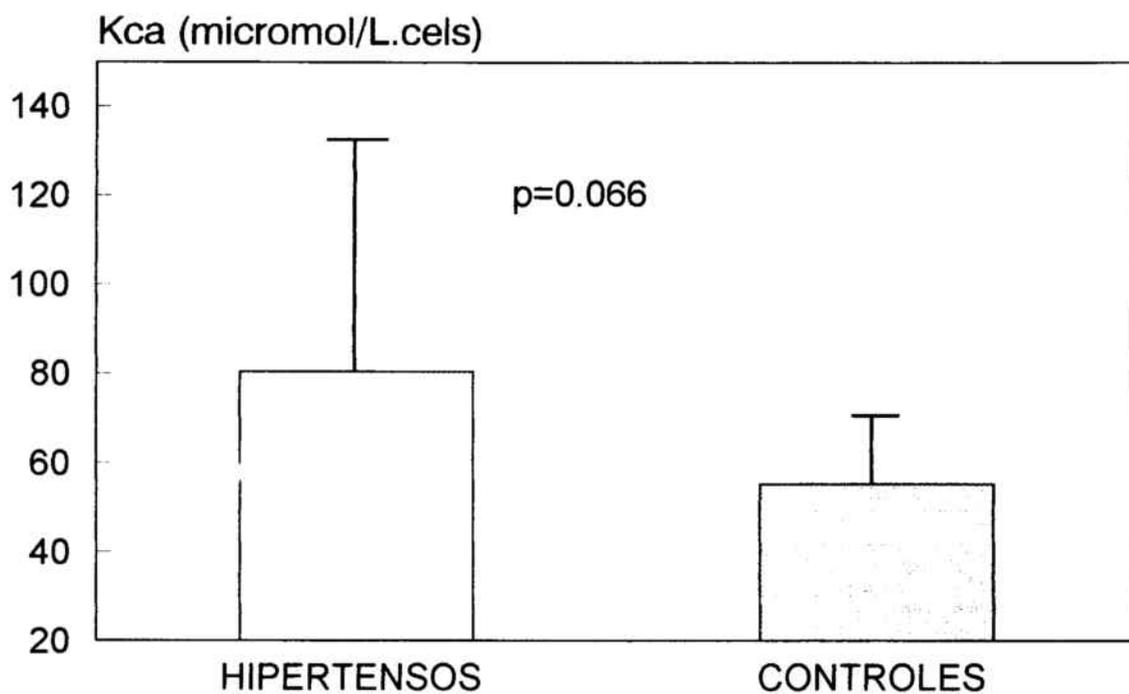


Figura 8. Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total (K_{ca}) en los 49 hipertensos esenciales y los 27 controles.



3. Relación de los parámetros cinéticos de la bomba de calcio con los parámetros analizados.

3.1. Serie global

3.1.1. Relación de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} con los parámetros estudiados.

La velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} mostró una relación directa estadísticamente significativa con varios parámetros: con la edad, con la presión arterial sistólica, diastólica y media, con las cifras de creatinina y ácido urico, y con el grosor del septo interventricular, los coeficientes de correlación y la significación estadística se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.

Parámetros que mostraron una relación directa con la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} .

| Parámetro | r | p |
|-----------------------------|---------|---------|
| Edad | 0.334 | 0.003 |
| Presión arterial sistólica | 0.369 | 0.001 |
| Presión arterial diastólica | 0.349 | 0.002 |
| Presión arterial media | 0.365 | 0.001 |
| Creatinina | 0.462 | < 0.001 |
| Aclaramiento creatinina | - 0.263 | 0.022 |
| Ácido úrico | 0.298 | 0.01 |
| Grosor septo | 0.281 | 0.02 |

3.1.2. Relación de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular con los parámetros estudiados.

La constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular mostró una relación directa estadísticamente significativa con varios parámetros: con la presión arterial sistólica, diastólica y media, con las cifras de creatinina y ácido urico, y con el índice de masa ventricular, los coeficientes de correlación y la significación estadística se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.

Parámetros que mostraron una relación directa con la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular.

| Parámetro | r | p |
|-----------------------------|----------|----------|
| Presión arterial sistólica | 0.308 | 0.007 |
| Presión arterial diastólica | 0.293 | 0.01 |
| Presión arterial media | 0.306 | 0.007 |
| Creatinina | 0.431 | < 0.001 |
| Ácido úrico | 0.29 | 0.012 |
| Índice de masa ventricular | 0.277 | 0.022 |

3.2. Grupo de pacientes con HTA esencial

3.2.1. Relación de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} con los parámetros estudiados.

La velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} mostró una relación directa estadísticamente significativa con la edad ($r=0.342$; $p=0.016$)(Figura 9), con las cifras de creatinina ($r=0.446$; $p=0.001$)(Figura 10) y con el valor del aclaramiento de la creatinina ($r= - 0.345$; $p=0.015$).

Figura 9. Correlacion directa entre la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} y la edad de los pacientes hipertensos esenciales.

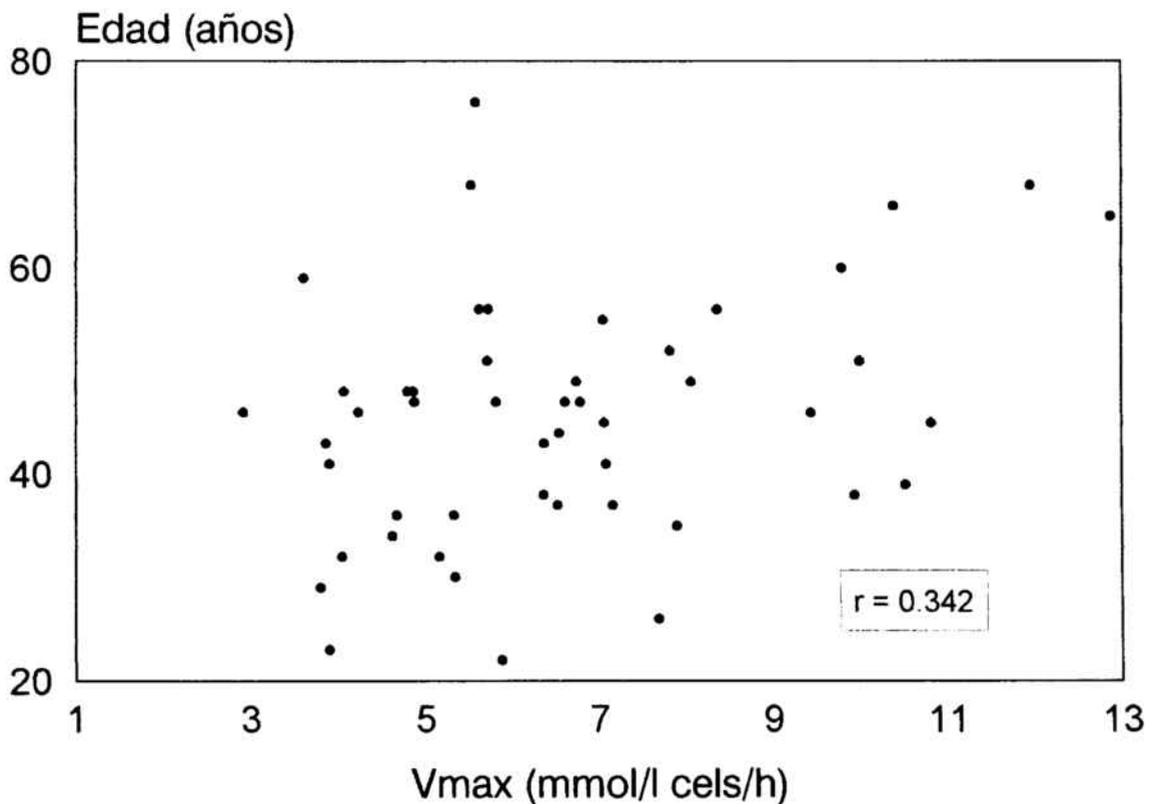
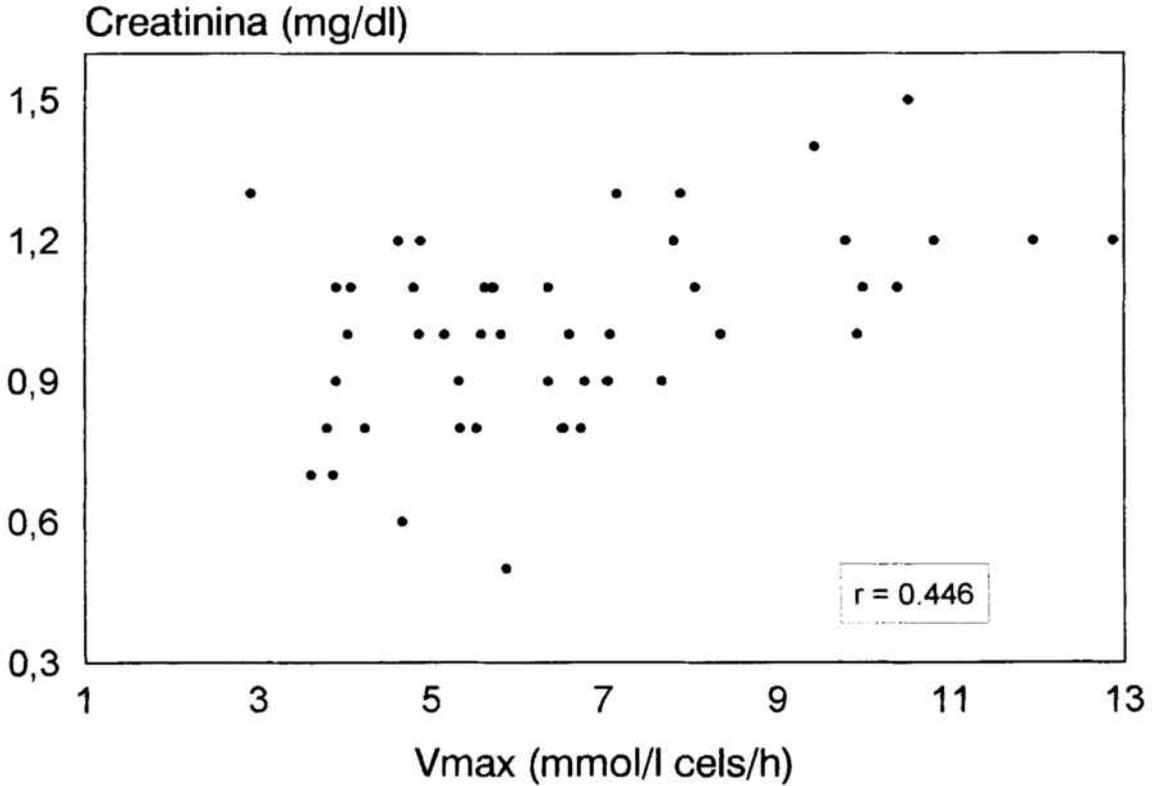


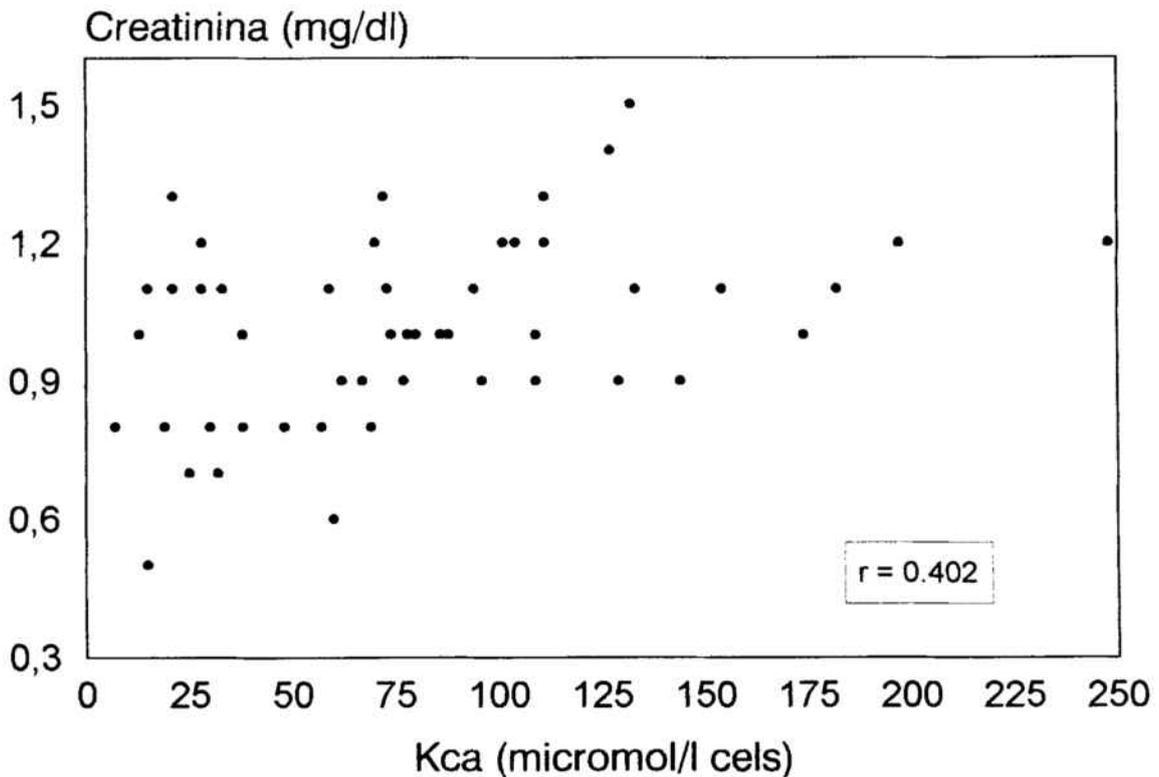
Figura 10. Correlacion directa entre la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} y las cifras de creatinina de los pacientes hipertensos esenciales.



3.2.2. Relación de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular con los parámetros estudiados.

La constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular únicamente mostró una relación directa estadísticamente significativa con las cifras de creatinina ($r=0.402$; $p=0.004$)(Figura 11).

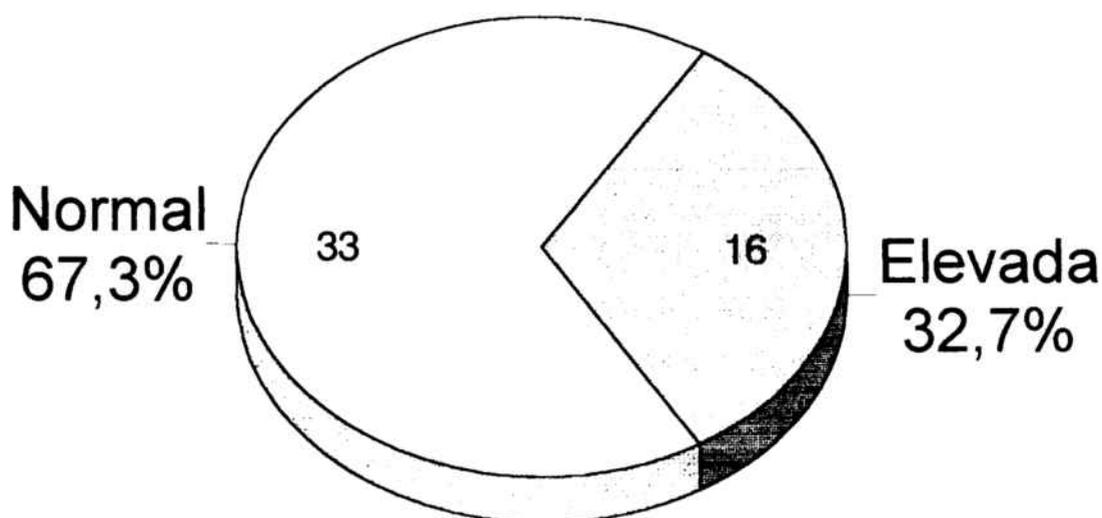
Figura 11. Correlación directa entre la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular y las cifras de creatinina de los pacientes hipertensos esenciales.



4. Clasificación de los pacientes con HTA esencial.

La distribución de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en la población sana normotensa seguía una distribución normal. Por el contrario, dicha distribución era bimodal en el grupo de pacientes hipertensos esenciales. Utilizando el intervalo de confianza del 99% del grupo control, como cálculo del límite alto de la normalidad y establecido éste en la cifra de 98 $\mu\text{mol/L.cels}$, se pudieron diferenciar dos grupos de pacientes hipertensos según presentaran una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal (33 pacientes, 67.3%) o por encima de dicho límite superior de la normalidad (16 pacientes, 32.6%). La figura 12 muestra la prevalencia de dicha alteración en la hipertensión arterial esencial.

Figura 12. Gráfico de sectores que muestra la prevalencia de la alteración de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en la población de hipertensos esenciales.



5. Diferencias clínico-biológicas entre los subgrupos de pacientes hipertensos

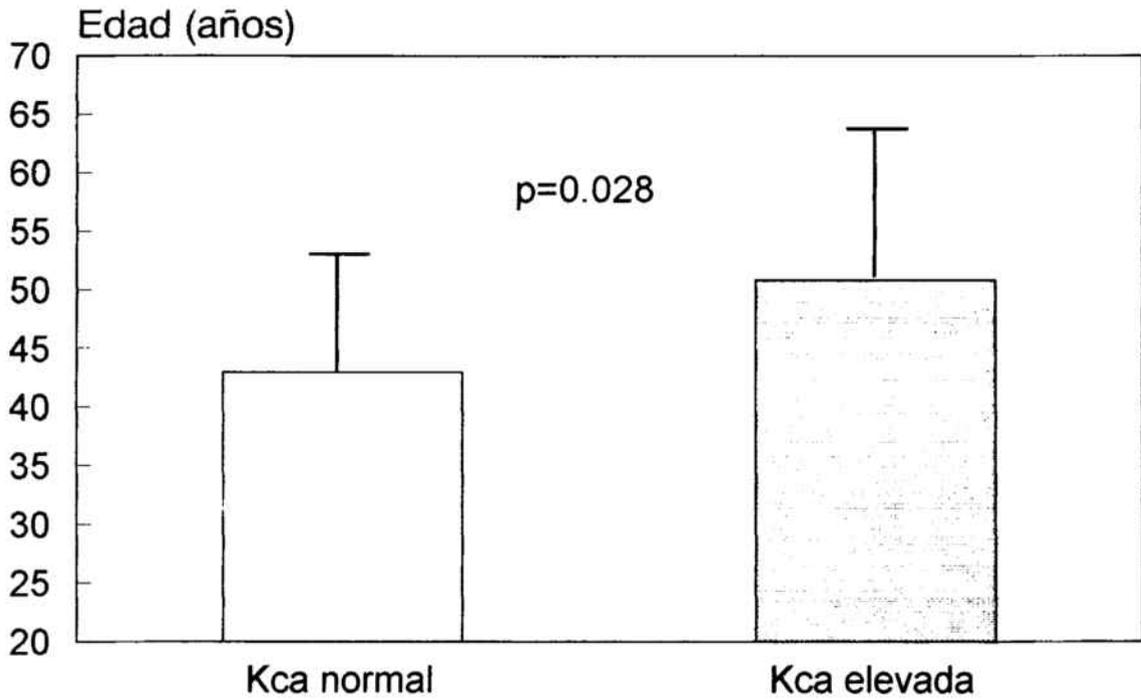
No se observaron diferencias significativas entre los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en cuanto a la talla, peso, sexo, cifras de presión arterial sistólica y diastólica (Tabla 7). Por el contrario, la edad de los pacientes fue significativamente mayor en los hipertensos con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular más elevada (50.8 ± 13.5 vs 43 ± 10.2 años; $p=0.028$) (Figura 13).

Tabla 7.

Comparación de los diferentes parámetros clínicos entre los pacientes hipertensos esenciales con constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal o elevada.

| Parámetro | Kca normal | Kca elevada | p |
|------------------------------------|-------------------|--------------------|-----|
| Presión arterial sistólica (mmHg) | 168.48 ± 8.68 | 174.37 ± 15.81 | 0.1 |
| Presión arterial diastólica (mmHg) | 102.42 ± 5.6 | 103.87 ± 7.54 | 0.4 |
| Presión arterial media (mmHg) | 124.44 ± 7.25 | 127.37 ± 9.39 | 0.2 |
| Talla (cm) | 165.75 ± 8.68 | 168.62 ± 12.32 | 0.3 |
| Peso (Kg) | 74.93 ± 10.18 | 81.31 ± 16.18 | 0.1 |

Figura 13. Diagrama de barras que muestra la edad media (\pm desviación estándar) en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular.



Resultados

Tanto la creatinina plasmática (1.13 ± 0.17 vs 0.95 ± 0.17 mg/dl; $p= 0.0019$), como el ácido úrico (7.27 ± 3.32 vs 6.14 ± 1.49 mg/dl; $p=0.0482$) se hallaron significativamente más elevados en el subgrupo de hipertensos con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular más elevada. (Figuras 14 y 15).

Figura 14. Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) de la creatinina plasmática en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular.

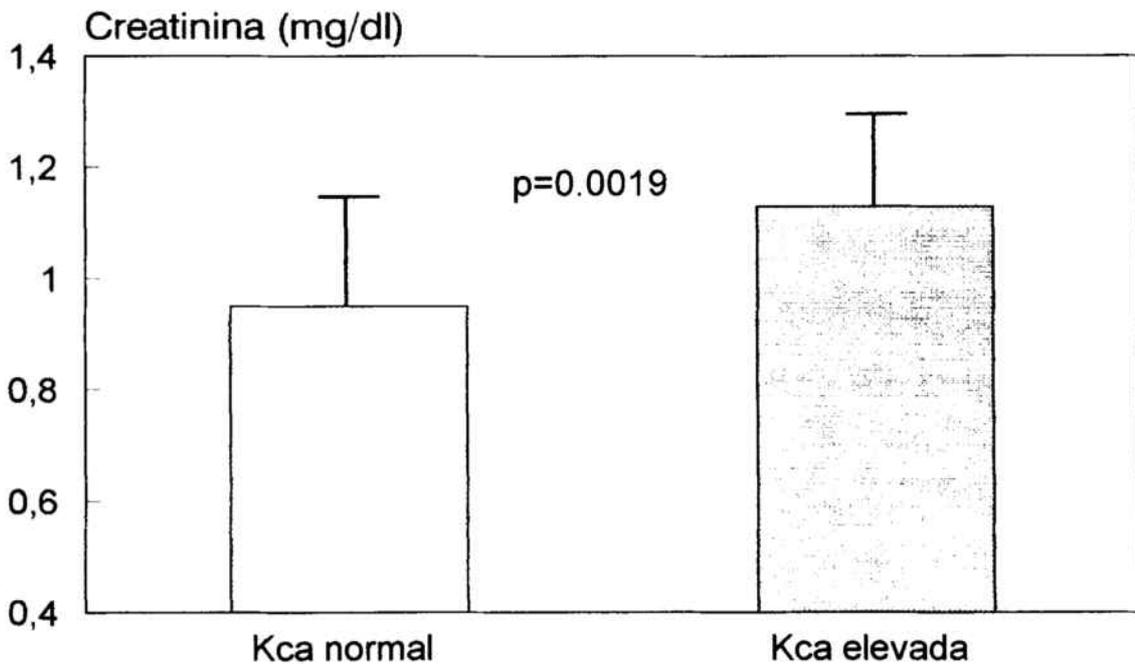
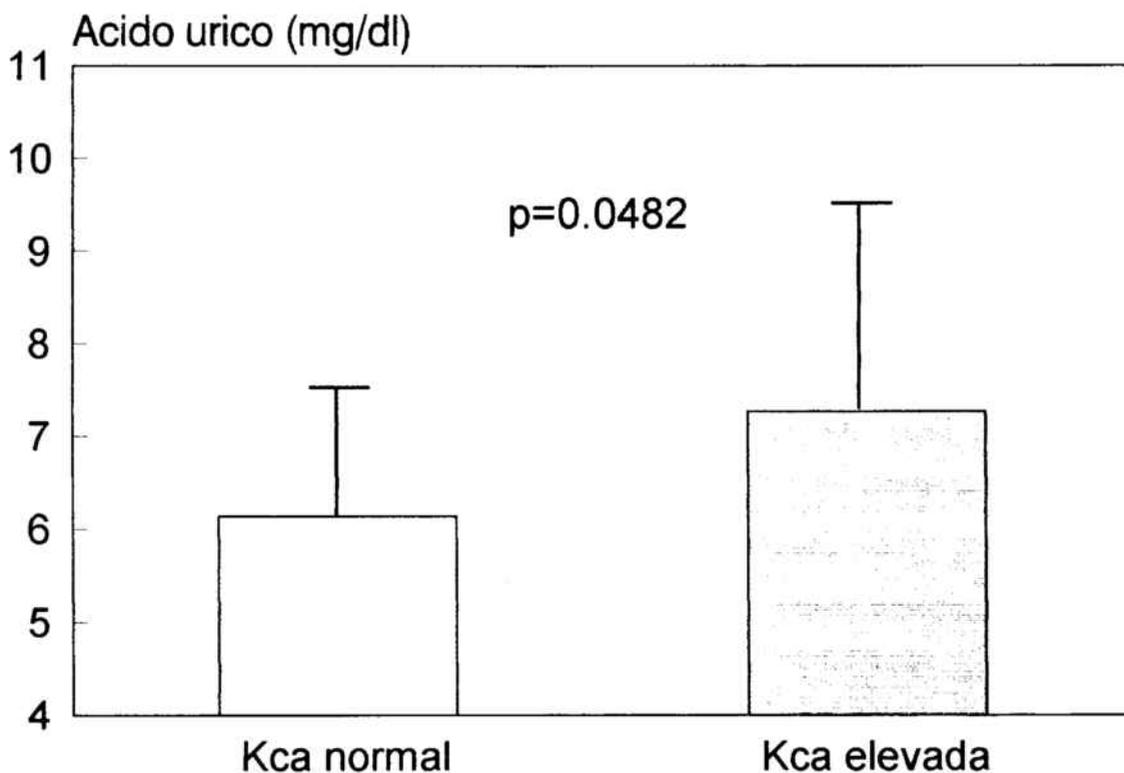


Figura 15. Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) del ácido úrico en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular.



Resultados

Tal como se observa en la Tabla 8, el resto de parámetros bioquímicos, hormonales y ecocardiográficos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales.

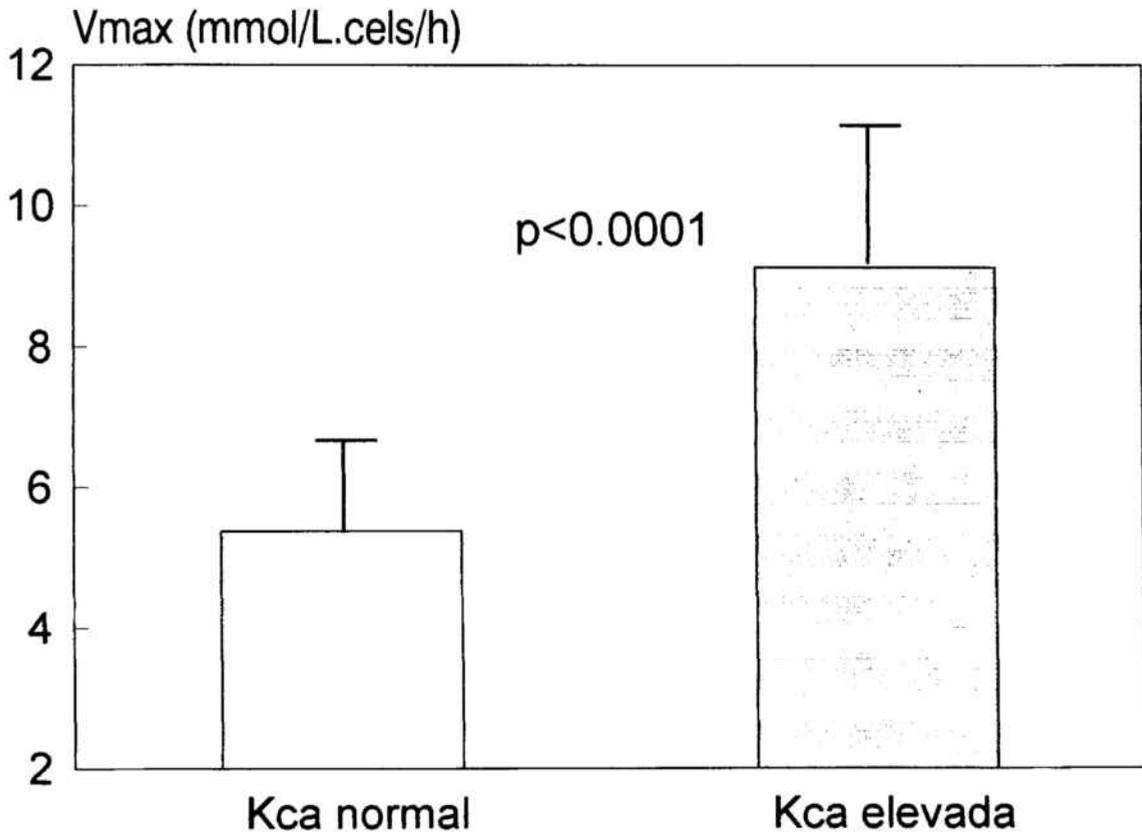
Tabla 8.

Comparación de los diferentes parámetros bioquímicos, hormonales y ecocardiográficos entre los pacientes hipertensos esenciales con constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal o elevada.

| Parámetro | Kca normal | Kca elevada | p |
|--|----------------|----------------|------|
| Glicemia (mg/dl) | 101.15 ± 26.7 | 117.37 ± 71.03 | 0.2 |
| Aclaramiento creatinina (ml/min) | 100.35 ± 20.75 | 89.51 ± 40.85 | 0.08 |
| Colesterol total (mg/dl) | 214.87 ± 41.57 | 207.5 ± 56.43 | 0.6 |
| Colesterol LDL (mg/dl) | 142.48 ± 38.1 | 134.81 ± 40.6 | 0.5 |
| Colesterol HDL (mg/dl) | 49.66 ± 8.73 | 48.5 ± 11.97 | 0.7 |
| Renina basal [ng(ml.h) ⁻¹] | 0.44 ± 0.31 | 0.47 ± 0.31 | 0.7 |
| Renina estimulada [ng(ml.h) ⁻¹] | 2.18 ± 2.34 | 2.62 ± 2.29 | 0.5 |
| Aldosterona (ng/ml) | 17.14 ± 10.91 | 20.58 ± 11.44 | 0.3 |
| Noradrenalina (pg/ml) | 214.81 ± 100.8 | 216.63 ± 93.52 | 0.9 |
| Factor natriuretico atrial (fmol/ml) | 14.28 ± 6.6 | 13.78 ± 5.71 | 0.8 |
| Diámetro telediastólico (mm) | 51.83 ± 5.1 | 53.27 ± 5.29 | 0.4 |
| Grosor pared posterior (mm) | 10.46 ± 1.54 | 10.81 ± 2.56 | 0.5 |
| Masa ventricular izquierda (gr) | 256.86 ± 76.33 | 293 ± 89.04 | 0.2 |
| Indice masa ventricular (gr/m ²) | 138.75 ± 39.31 | 146.02 ± 44.49 | 0.6 |

Finalmente, el subgrupo de pacientes con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular elevada presentaba una velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} mucho mayor que el subgrupo de pacientes con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal (9.13 ± 2.02 vs 5.38 ± 12.81 mmol/L.cels/h; $p < 0.0001$) Figura 16.

Figura 16. Diagrama de barras que muestra los valores medios (\pm desviación estándar) de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} en los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales clasificados en función de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular.



VI. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que la prevalencia de la anomalía de la bomba de Ca^{2+} en la HTAe es del 32.7%. Estos pacientes se caracterizan por presentar mayor edad y deterioro de la función renal, determinada por unas cifras de ácido úrico y creatinina plasmáticas más elevadas.

El hallazgo de esta anomalía en un tercio de los hipertensos estudiados confirma la observación de Dagher et al²⁶², en el sentido de que en la HTA esencial no existe una alteración homogénea y universal de la bomba de calcio en todos los hipertensos, y hace suponer que la HTA esencial se comporta de forma heterogénea en relación al flujo de Ca^{2+} dependiente de la bomba de calcio, dado que dos tercios de los pacientes hipertensos esenciales presentan una bomba de calcio normal, mientras que el tercio restante tienen una baja afinidad por el Ca^{2+} intracelular, estimado como una baja afinidad aparente para el Sr^{2+} intracelular y un incremento del flujo máximo de salida del Sr^{2+} . Utilizando una nomenclatura similar a la aceptada para las anomalías de la bomba de sodio ($\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$) y a los pacientes con anomalía de la cinética de la bomba de Ca^{2+} eritrocitaria se les podría denominar hipertensos bomba de Ca^{2+} (-).

Similares prevalencias de anomalías se han encontrado al estudiar los diferentes sistemas de transporte celular del Na^+ : entre el 18% y el 39% de los hipertensos⁵⁴ presentan anomalía del cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, entre el 26% y el 49% presentan anomalía⁶⁵ del cotransporte Na^+/Li^+ , en un 23% de pacientes la actividad del intercambiador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ está anormalmente elevada⁷², un 45 % de hipertensos tienen alterado⁷⁴ el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ y hasta un 60% de

hipertensos⁶⁹ presentan una hiperactivación del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$. Todo ello apoya más la heterogeneidad de la HTA en relación con los sistemas de transporte transmembranario.

El hallazgo de un deterioro de la función renal en el grupo de pacientes bomba de Ca^{2+} (-), expresado por unos valores de creatinina y ácido úrico más elevados, podría indicar una mayor susceptibilidad de este grupo de pacientes a desarrollar lesión renal secundaria a la HTAe. Una interpretación alternativa podría ser que algunos componentes plasmáticos circulantes presentes en pacientes con insuficiencia renal inhibieran la bomba de Ca^{2+} como recientemente han comunicado Lindner et al^{274,275}.

De nuestros resultados se desprende que estos pacientes, hipertensos bomba de Ca^{2+} (-), tienen una baja afinidad por el Ca^{2+} intracelular, al tiempo que una velocidad máxima de la bomba aumentada, por lo que probablemente bajo condiciones basales mantienen una concentración normal de Ca^{2+} citosólico, pues el incremento de la velocidad máxima de salida del Ca^{2+} puede compensar la baja afinidad por el Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, estos pacientes presentan una disminución de la capacidad para regular incrementos en el contenido de Ca^{2+} libre citosólico.

La bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática es el único sistema de transporte de Ca^{2+} que regula el contenido de Ca^{2+} libre citosólico en los hematíes humanos. Sin embargo, en las células nucleadas el contratransporte $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ y la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico también contribuyen a la regulación de los

incrementos en la concentración del Ca^{2+} libre citosólico. Comparadas con otras células excitables, la capacidad de almacenar Ca^{2+} en depósitos intracelulares por las células de la musculatura lisa vascular es escasa y su contrartransporte $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ es de muy baja capacidad respecto a la bomba de Ca^{2+} de la membrana. De este modo, las células de la musculatura lisa vascular son las células diana donde la alteración presente en los pacientes bomba de Ca^{2+} (-) induciría desórdenes en la regulación del Ca^{2+} celular, caracterizadas por un retraso en la recuperación del contenido normal de Ca^{2+} que sigue a la apertura de los canales del Ca^{2+} . Esto puede explicar el incremento de reactividad vascular presente en los pacientes hipertensos. Una bomba de Ca^{2+} anómala podría también promover un incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico y, por tanto, una hiperactividad celular, como ya previamente se ha comunicado en plaquetas de ratas y pacientes con HTA esencial²²⁵.

No es aventurado suponer que este defecto en la estimulación del transporte activo del Ca^{2+} pueda, a nivel de las células del músculo liso vascular, determinar una dificultad en la extrusión del exceso de Ca^{2+} libre citosólico que tiene lugar tras la apertura de los canales membranaarios cuando se inicia la contracción muscular. El resultado final sería el incremento del Ca^{2+} libre citosólico y consecuentemente del tono de dicha célula, determinante último del incremento de las resistencias periféricas vasculares. Esta hipótesis es actualmente especulativa y se requieren ulteriores estudios para probarla o desestimarla.

VI. Resumen y conclusiones

Nuestra hipótesis de trabajo postula la existencia de un grupo de pacientes hipertensos con una posible alteración de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente, definida por una disminución de la afinidad de dicha bomba para el calcio intracelular, hecho que podría explicar, en parte, el aumento del contenido de Ca^{2+} observado por múltiples autores en diferentes células de pacientes afectados de hipertensión arterial esencial.

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido determinar la prevalencia de la anomalía de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en los pacientes afectados de HTA esencial y correlacionar esta alteración con posibles hallazgos clínicos diferenciales.

Para ello se han estudiado 76 individuos, de los que 27 constituyen un grupo control de sujetos sanos normotensos, sin antecedentes familiares de HTA. El grupo de pacientes con HTA esencial lo constituyen 49 individuos, a los que se había suspendido el tratamiento antihipertensivo durante las 4 semanas previas a la obtención de la muestra sanguínea, ninguno de ellos presentaba hallazgos clínicos que sugirieran la existencia de HTA secundaria de cualquier etiología. Se ha elegido el hematíe como modelo celular por su fácil obtención y manipulación. Utilizamos el Sr^{2+} como análogo del Ca^{2+} para el estudio de la bomba de Ca^{2+} . Las concentraciones intracelulares de Sr^{2+} y Ca^{2+} se modificaron utilizando el ionóforo A23187 en una solución isotónica de Ringer. Para cada sujeto estudiado se prepararon de 8 a 12 alícuotas de células conteniendo diferentes concentraciones intracelulares de Sr^{2+} y de Ca^{2+} . Las 4-6 primeras con

concentraciones crecientes de Sr^{2+} (0.2-3 mmol/l céls) y las 4-6 siguientes con concentraciones crecientes de Ca^{2+} (0.1-2 mmol/l céls) y una concentración fija de Sr^{2+} equivalente a la máxima alcanzada en las anteriores. Para la medida del flujo de Sr^{2+} , las alícuotas se suspendieron en el mismo medio Ringer con la adición de Mg Cl_2 1 mmol/l, necesario para el funcionamiento de la bomba de Ca^{2+} , y se incubaron a 37°C durante 15 minutos bajo agitación continua.

Para cada sujeto estudiado, el flujo de Sr^{2+} se representó en función de la concentración intracelular de Sr^{2+} . Igual que sucede con el Ca^{2+} , la estimulación del flujo de Sr^{2+} por el aumento en la concentración intracelular de dicho ion es claramente sigmoide, y en dicha parte de la curva es posible calcular la constante de disociación para el Sr^{2+} y la velocidad máxima de flujo. Asimismo, el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} provoca una inhibición competitiva del flujo de Sr^{2+} , a partir de la cual puede estimarse la constante de disociación para el Ca^{2+} .

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones

- 1) Los valores medios de la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} , en el grupo de pacientes hipertensos esenciales, fueron 6.6 ± 2.3 milimoles por Litro de células y por hora, significativamente superiores a los observados en el grupo control que fueron de 5.2 ± 1.5 ($p=0.0067$). Los valores medios de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total fueron 80.36 ± 53.46 micromoles por litro de célula en el grupo de pacientes hipertensos, cifras ligeramente superiores a las del grupo

control, 55.25 ± 15.13 micromoles por litro de célula, aunque no estadísticamente significativas ($p=0.066$).

2) No se observa relación entre los parámetros cinéticos de la bomba de calcio y el sexo, las cifras de presión arterial, parámetros bioquímicos, hormonales y ecocardiográficos de los pacientes hipertensos. Existe una correlación directa significativa entre la velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} y la edad ($r=0.342$; $p=0.016$) y cifras de creatinina ($r=0.446$; $p=0.001$), e inversa con el valor del aclaramiento de la creatinina ($r= - 0.345$; $p=0.015$). La constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular únicamente mostró una relación directa estadísticamente significativa con las cifras de creatinina ($r= 0.402$; $p=0.004$).

3) Al utilizar el intervalo de confianza del 99% de los valores de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular en el grupo control como límite superior de la normalidad ($98 \mu\text{mol/L.cels}$) se han diferenciado dos grupos de pacientes hipertensos esenciales según presentaran una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal, 33 pacientes (67.3%), o por encima de dicho límite superior de la normalidad, 16 pacientes (32,6%).

4) El grupo de pacientes con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular más elevada, pacientes bomba de Ca^{2+} (-), presentaban respecto al resto de hipertensos estudiados:

1. Edad superior (50.8 ± 13.5 vs 43 ± 10.2 años; $p=0.028$)
2. Mayor valor de creatinina plasmática (1.13 ± 0.17 vs 0.95 ± 0.17 mg/dl; $p= 0.0019$).
3. Niveles de ácido úrico más elevados (7.27 ± 3.32 vs 6.14 ± 1.49 mg/dl; $p=0.0482$).

No se han observado diferencias significativas en el resto de parámetros bioquímicos, hormonales y ecocardiográficos estudiados entre los dos subgrupos de pacientes hipertensos esenciales.

5) Por último, el subgrupo de pacientes con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular elevada, pacientes bomba de Ca^{2+} (-), presentaba una velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} mucho mayor que el subgrupo de pacientes con una constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular normal (9.13 ± 2.02 vs 5.38 ± 12.81 mmol/L.cels/h; $p<0.0001$), probablemente como fenómeno compensador.

6) Conclusión general

Las anomalías del transporte iónico celular en la HTAe son heterogéneas, no afectan a la globalidad de la población, y se restringen a subgrupos de pacientes. La anomalía de la bomba de Ca^{2+} se halla presente en el 33% de los hipertensos esenciales.

El perfil clínico de estos pacientes es muy similar al de los pacientes caracterizados por otras anomalías, y destaca únicamente la mayor edad y la afectación renal.

Ulteriores estudios deberán clarificar si este subgrupo de pacientes caracterizados por la anomalía de la bomba de Ca^{2+} están relacionados con la sensibilidad a la sal y son los posibles beneficiarios de los suplementos orales de calcio. La alteración de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente, definida por una disminución de la afinidad de dicha bomba para el calcio intracelular, podría explicar en parte el exceso en el contenido de Ca^{2+} citosólico, observado por múltiples autores, en las diferentes células de pacientes afectados de hipertensión arterial esencial.

VIII. Bibliografía

Bibliografía

1. Coca A. Flujos de sodio y potasio a través de la membrana eritrocitaria en la hipertensión arterial esencial. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona 1983; 1-454.
2. De la Sierra A. Estudio cinético de los sistemas de transporte transmembranoso de sodio en la hipertensión arterial esencial. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona 1987; 1-449.
3. De la Sierra A, Hannaert PA, Senn N, Ollivier JP, Garay RP. Kinetic study of the Ca^{2+} pump in erythrocytes from essential hypertensive patients. *J Hypertens* 1990; 8: 285-293.
4. Beard TC. A salt-hypertension hypothesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 (suppl 7): 35-38.
5. Blackburn H, Prineas R. Diet and hypertension: anthropology, epidemiology and public health implications. En: Paoletti R, ed. *Progress in biochemical pharmacology*, vol 9. Basel: Karger, 1983: 31-79.
6. Ambard L, Beaujard E. Causes de l'hypertension artérielle. *Arch Gen Med* 1904; 1: 520-533.
7. Page LB. Epidemiologic evidence on the etiology of human hypertension and its possible prevention. *Am Heart J* 1976; 91: 527-534.
8. Hunt JC. Sodium intake and hypertension: a cause for concern. *Ann Intern Med* 1983; 98: 724-728.
9. Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *Br Med J* 1988; 297: 319-328.
10. Grollman A, Harrison TR, Williams JR. Effect of various sterol derivates on blood pressure of rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1940; 69: 149-155.
11. Dahl LK. Effects of chronic excess salt feeding. Induction of self-sustained hypertension in rats. *J Exp Med* 1961; 114: 231-236.
12. Medical Research Council. The rice diet in the treatment of hypertension. *Lancet* 1950; 2: 509-513.

Bibliografía

13. Hatch FT, Wertheim AR, Eurman GH, et al. Effects of diet in essential hypertension. Alterations in sodium chloride, protein and fat intake. *Am J Med* 1954; 17: 499-513.
14. Morgan TO, Myers JB. Hypertension treated by sodium restriction. *Med J Aust* 1981; 2: 396-397.
15. Luft FC, Miller JZ, Weinberger MH, Christian JC, Skrabal F. Genetic influences on the response to dietary salt reduction, acute salt loading or salt depletion in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12 (suppl 13): 549-555.
16. Schroeder HA. Relation between mortality from cardiovascular disease and treated water supplies: variations in states and 163 largest municipalities of the United States. *JAMA* 1960; 172: 1902-1908.
17. Stitt FW, Crawford MD, Clayton DG, Morris JN. Clinical and biochemical indicators of cardiovascular disease among men living in hard and soft water areas. *Lancet* 1973; 1:122-126.
18. Neri LC, Johansen HL. Water hardness and cardiovascular mortality. *Ann NY Acad Sci* 1978; 304: 203-219.
19. McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, Stanton JL. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Sciences* 1984; 224: 1392-1398.
20. Harlan WR, Hull AL, Schomouder RL, Landis JR, Thompson FE, Larkin FA. Blood pressure and nutrition in adults. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 17-28.
21. McCarron DA. Is calcium more important than sodium in the pathogenesis of essential hypertension?. *Hypertension* 1985; 7: 607-627.
22. McCarron DA, Pingree PA, Rubin RJ, Gaucher SM, Molitch M, Krutzik S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak. *Hypertension* 1980; 2: 162-168.
23. McCarron DA, Morris CD, Cole C. Dietary calcium in human hypertension. *Science* 1982; 217: 267-269.
24. Ackley S, Barret-Connor E, Suarez L. Dairy products, calcium and blood pressure. *Am J Clin Nutr* 1983; 38: 457-461.

Bibliografía

25. Garcia-Palmieri MR, Costas R, Cruz-Vidal M, Sorlie PD, Tillotson J, Havlik RJ. Milk consumption, calcium intake and decreased hypertension in Puerto Rico: Puerto Rico Heart Health Program Study. *Hypertension* 1984; 6: 322-328.
26. McCarron Da. Low serum concentrations of ionized calcium in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1982; 307: 226-228.
27. Resnick LM, Laragh JH, Sealey JE, Alderman MH. Divalent cations in essential hypertension: relations between serum ionized calcium, magnesium and plasma renin activity. *N Engl J Med* 1983; 309: 888-891.
28. Siddiqui JA, Rana IA. Mineral and parathyroid hormone inter-relationships in normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *J Pak Med Assoc* 1993; 43: 92-95.
29. Strazzullo P, Nunziata V, Cirillo M, Giannattasio R, Ferrara LA, Mattioli PL, Mancini M. Abnormalities of calcium metabolism in essential hypertension. *Clin Sci* 1983; 65: 359-363.
30. Ljunghall S, Hedstrands H. Serum phosphate is inversely related to blood pressure. *Br Med J* 1977; 1: 553-554.
31. Daniels J, Goodman AD. Hypertension and hyperparathyroidism: inverse relation of serum phosphate levels and blood pressure. *Am J Med* 1983; 73: 17-23.
32. McCarron DA, Morris CD. Oral Ca^{2+} in mild to moderate hypertension: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Res* 1984; 32: 335A.
33. Erne B, Bolli P, Burgisser E, Buhler FR. Correlation of platelet calcium with blood pressure. Effect of the antihypertensive therapy. *N Engl J Med* 1984; 310: 1084-1088.
34. Tobian L, Binion JT. Tissue cations and water in arterial hypertension. *Circulation* 1952; 5: 754-758.
35. Garay R. Na^+ transport, natriuretic hormones and primary hypertension. *J Hypertension* 1986; 4 (suppl 5): S216-S218.
36. Garay R, Rosati C, Meyer P. Na^+ transport in primary hypertension. *Ann NY Acad Sci* 1986; 488: 187-195.

Bibliografía

37. Losse H, Wehmeyer H, Wessels F. Der Wasser-und Elektrolytgehalt von Erythrocyten bei arterieller Hypertonie. *Klin Wochenschr* 1960; 38: 393-395.
38. Wessels FG, Junge-Hulsing G, Losse M. Untersuchungen zur Natrium permeabilität der Erythrozyten bei Hypertonikern und Normotonikern mit familiärer Hochdruckbelastung. *Z Kreislauff* 1967; 56: 374-380.
39. Clegg G, Davidson C, Morgan DB. The heterogeneity of essential hypertension. Relation between lithium efflux and sodium content of erythrocytes and a family history of hypertension. *Lancet* 1982; 2: 891-894.
40. Losse H, Zidek W, Zumkley H, Wessels F, Vetter H. Intracellular Na⁺ as a genetic marker of essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1981; 3: 627-640.
41. Postnov YV, Orlov SN, Gulak P, Schevchenko AS. Altered permeability of the erythrocyte membrane for sodium, potassium in spontaneously hypertensive rats. *Pflügers Arch* 1976; 365: 257-265.
42. Gudmundsson O, Herlitz H, Jonsson O, Hedner T, Andersson O, Berglund G. Blood pressure and intra-erythrocyte sodium during normal and high salt intake in middle-aged men: relationship to family history of hypertension, and neurogenic and hormonal variables. *Clin Sci* 1984; 66: 427-433.
43. Garay RP, Nazaret C. Na⁺ leak in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Clin Sci* 1985; 69: 613-624.
44. Wessels F, Zumkley H. New aspects concerning the ²²sodium influx into red cells in essential hypertension. *Klin Wochenschr* 1985; 63 (Suppl III): 38-41.
45. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbano-Márquez A. Abnormal sodium leak in erythrocytes from a group of essential hypertensive patients. *Klin Wochenschr* 1989; 67: 31-37.
46. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6259-6263.

Bibliografía

47. Diez J, Hannaert P, Garay R. A kinetic study of the Na⁺, K⁺-pump in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Am J Physiol* 1987; 252: H1-H6.
48. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbano-Márquez A. Abnormal Na⁺-K⁺ ATPase kinetics in a subset of essential hypertensive patients. *Eur J Clin Invest* 1988; 18: 337-342.
49. Garay RP, Meyer P. A new test showing abnormal net Na⁺ and K⁺ fluxes in erythrocytes of essential hypertensive patients. *Lancet* 1979; 1: 349-353.
50. Garay RP, Dagher G, Pernollet MG, Devynck MA, Meyer P. Inherited defect in a Na⁺, K⁺-co-transport system in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Nature* 1980; 284: 281-283.
51. Tuck ML, Gross C, Maxwell MH, Brickman AS, Krasnoshtein G, Mayes D. Erythrocyte Na⁺,K⁺ cotransport and Na⁺,K⁺ pump in black and caucasian hypertensive patients. *Hypertension* 1984; 6: 536-544.
52. Garay RP, Nazaret C, Dagher G, Bertrand E, Meyer P. A genetic approach to the geography of hypertension: examination of Na⁺-K⁺ cotransport in Ivory Coast africans. *Clin Exp Hypertens* 1981; 3: 861-870.
53. Garay RP, Nazaret C, Hannaert P, Price M. Abnormal Na⁺, K⁺ cotransport function in a group of patients with essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 311-320.
54. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbano-Márquez A. Outward Na⁺-K⁺ cotransport function in erythrocytes from essential hypertensives. *J Hum Hypertens* 1989; 3: 1-8.
55. Canessa M, Adragna N, Solomon HS, Connolly TM, Tosteson DC. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *E Engl J Med* 1980; 302: 772-776.
56. Canessa M, Bize I, Solomon H, et al. Na countertransport and cotransport in human red cells: fuction, dysfunction and genes in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1981; 3: 783-795.
57. Smith JB, Ash KO, Hunt SC, et al. Three red cell sodium transport systems in hypertensive and normotensive Utah adults. *Hypertension* 1984; 6: 159-166.

Bibliografía

58. Trevisan M, Ostrow D, Cooper R, et al. Abnormal red blood cell ion transport and hypertension. The people's gas company study: Hypertension 1983; 5: 363-367.
59. Brugnara C, Corrocher R, Foroni L, Steinmayr L, Bonfanti F, De Sandre G. Lithium-sodium countertransport in erythrocytes of normal and hypertensive subjects. Relationship with age and plasma renin activity. Hypertension 1983; 5: 529-534.
60. Cooper R, Trevisan M, Ostrow D, Sempos C, Stamler J. Blood pressure and sodium-lithium countertransport: findings in population-based surveys. J Hypertens 1984; 2: 467-471.
61. Woods JW, Falk RJ, Pittman AW, Klemmer PJ, Watson BS, Namboodiri K. Increased red-cell sodium-lithium countertransport in normotensive sons of hypertensive parents. N Engl J Med 1982; 306: 593-595.
62. Canessa M, Spalvins A, Adragna N, Falkner B. Red cell sodium countertransport in normotensive and hypertensive blacks. Hypertension 1984; 6: 344-351.
63. Canessa M. The polymorphisms of red cell Na and K transport in essential hypertension: findings, controversies, and perspectives. Prog Clin Biol Res 1984; 159: 293-315.
64. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbano-Márquez A. Na⁺-Li⁺ countertransport in essential hypertension. J Hypertens 1988; 6: 931-937.
65. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Clinical profiles and erythrocyte Na⁺ transport of four major types of essential hypertension in Spain. Kidney Int 1989; 36: 114-119.
66. Livne H, Balfe JW, Veitch R, Marquez-Julio A, Grinstein S, Rothstein A. Increased platelet Na-H exchange rates in essential hypertension: application of a novel test. Lancet 1987; i: 533-536.
67. Schmouder RL, Weder AB. Platelet sodium-proton exchange is increased in essential hypertension. J Hypertens 1989; 7: 325-330.
68. Canessa M, Morgan K, Goldszer R, Moore TJ, Spalvins A. Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive patients. Hypertension 1991; 17: 340-348.

Bibliografía

69. De la Sierra A, Coca A, Paré JC, Sanchez M, Compte M, Azqueta M, Urbano-Marquez A. Clinical profiles of essential hypertensives based on their ion transport abnormalities. *J Hypertens* 1993; 11(suppl 5): S250-S251.
70. Orlov SN, Postnov IY, Pokudin NI, Kurharenko VY, Postnov YV. Na^+ - K^+ exchange and other ion-transport systems in erythrocytes of essential hypertensives and spontaneously hypertensive rats: a comparative analysis. *J Hypertens* 1989; 7: 781-788.
71. Esparza N. Estudio de la actividad de los mecanismos reguladores del pH intracelular en eritrocitos de sujetos sanos. Influencia de la historia familiar de hipertensión arterial. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. Pamplona, 1991; 1-214.
72. Diez J, Arrázola A, Castiella J, Iñigo B, Cía P. Increased activity of the Na^+ -dependent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anion exchanger. A new abnormality of red blood cell Na^+ transport in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1991; 4: 95A.
73. Diez J, Arrázola A, Castiella J, Iñigo B, Cía P. Increased activity of the Na^+ -dependent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anion exchanger in red cells of patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1992; 10: 579-585.
74. Picado M.J. Estudio del intercambiador sodio-magnesio en la hipertensión arterial esencial. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona 1995; 1-157.
75. Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *J Cardiovas Pharmacol* 1988; 12 (suppl 5): S56-S58.
76. Nichols DG. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. *Biochem J* 1978; 176: 511-522.
77. Chapman RA. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 1979; 35: 1-52.
78. Nowycky M, Fox A, Tsien R. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 86: 1-30.
79. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial cells. *J Physiol* 1988; 395: 233-253.

Bibliografía

80. Blaustein MP, Nelson MT. Sodium-calcium exchange: its role in the regulation of cell calcium. En: Carafoli E, ed. *Membrane transport of calcium*. London, Academic Press 1982; 217-236.
81. Schatzmann HJ. ATP dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. *Experientia* 1966, 22: 364-365.
82. Minocherhomjee AM, Beauregard G, Potier M, Roufogalis BD. The molecular weight of the Ca^{2+} -transport ATPase of the human red blood cell determined by radiation inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116: 895-900.
83. Cavieres JD. Calmodulin and the target size of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase of human red cell ghosts. *Biochim Biophys Acta* 1984; 771: 241-246.
84. Hymel L, Nielsen M, Gietzen K. Target size of human erythrocyte membrane Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in the presence and absence of calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 1985; 815: 461-467.
85. Lew VL, Tsien RY, Miner C, Bookchin RM. Physiological (Ca_i^{2+}) level and pump-leak in intact red cells measured using incorporated Ca chelator. *Nature* 1982; 298: 478-481.
86. Kratje RB, Garrahan PJ, Rega AF. Two modes of inhibition of the Ca^{2+} pump in red cells by Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 1985; 816: 365-378.
87. Schatzmann HJ. The red cell calcium pump. *Ann Rev Physiol* 1983; 45: 303-312.
88. Richards DF, Rega AF, Garrahan PJ. Two classes of site for ATP in the Ca^{2+} -ATPase from human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1978; 511: 194-211.
89. Schatzmann HJ. The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. En: Carafoli E, ed. *Membrane Transport of Calcium*. London, Academic Press 1982; 41-108.
90. Simons TJB. Active transport of lead by human red cells. *FEBS Lett* 1984; 172: 250-254.
91. Rossi JPFC, Schatzmann HJ. Is the red cell calcium pump electrogenic? *J Physiol* 1982; 327: 1-15.

Bibliografía

92. Smallwood JI, Waisman DM, Lafreniere D, Rasmussen H. Evidence that erythrocyte calcium pump catalyzes a $\text{Ca}^{2+}:\text{nH}^{+}$ exchange. *J Biol Chem* 1983; 258: 11092-11097.
93. Garrahan PJ, Rega AF. Activation of partial reactions of the Ca^{2+} -ATPase from human red cells by Mg^{2+} and ATP. *Biochim Biophys Acta* 1978; 513: 59-65.
94. Gopinath RM, Vincenzi FF. Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77: 1203-1209.
95. Jarrett HW, Penniston JT. Partial purification of the $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPase activator from human erythrocytes. Its similarity to the activator of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77: 1210-1216
96. Foder B, Scharff O. Decrease of apparent calmodulin affinity of erythrocyte $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPase at low Ca^{2+} concentration. *Biochim Biophys Acta* 1981; 649: 367-376.
97. Scharff O. Ca^{2+} activation of membrane-bound $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -dependent ATPase from human erythrocytes prepared in the presence or absence of Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 1976; 443: 206-218.
98. Vincenzi F. Regulation of a plasma membrane calcium pump: A speculative model. *Ann NY Acad Sci* 1978; 307: 229-231.
99. Missiaen L, Vrolix M, Raeymaekers L, Casteels R. Regulation of the Ca^{2+} -transport ATPases of smooth-muscle cells. *Adv Prot Phosphatases* 1989; 5: 239-260.
100. Wuytack F, De Schutter G, Casteels R. Purification of $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from smooth muscle by calmodulin affinity chromatography. *FEBS Lett* 1981; 129: 297-300.
101. Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Hofmann F, Casteels R. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca^{2+} pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol. *Biochem J* 1988; 255: 855-863.
102. Furakawa KI, Nakamura H. Characterization of the $(\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+})$ -ATPase purified by calmodulin affinity chromatography from bovine aortic smooth muscle. *J Biochem* 1987; 101: 287-290.

Bibliografía

103. Eggermont JA, Raeymaekers L, Casteels R. Ca^{2+} -transport by smooth muscle membranes and its regulation. *Biomed Biochim Acta* 1989; 48: S370-S381.
104. Pershadsing HA, McDonald JM. Direct addition of insulin inhibits a high affinity Ca^{2+} -ATPase in isolated adipocyte plasma membranes. *Nature* 1979; 281: 495-497.
105. Ghijsen WE, Van Os CH. $1\alpha,25$ -dihydroxy-Vitamin D-3 regulates ATP-dependent calcium transport in basolateral plasma membranes of rat enterocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 689: 170-172.
106. Soloft MS, Sweet P. Oxytocin inhibition of $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J Biol Chem* 1982; 257: 10687-10693.
107. Davis PJ, Blas SD. In vitro stimulation of human red blood cell Ca^{2+} ATPase by thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 99: 1073-1080.
108. Verbost PM, Flick G, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J Membr Biol* 1988; 102: 97-104.
109. McLennan DH. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1970; 245:4508-4518.
110. Kirchberger MA, Tada M. Effects of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on sarcoplasmic reticulum isolated from cardiac and slow and fast contracting skeletal muscles. *J Biol Chem* 1976; 251: 725-729.
111. Eggermont JA, Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Circ Res* 1988; 62: 266-278.
112. Raeymaekers L, Jones RL. Evidences for the presence of phospholomban in the endoplasmic reticulum of smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* 1986; 882: 258-265.
113. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and the external ion composition. *J Physiol* 1968; 195: 451-470.

Bibliografía

114. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 395-433.
115. Carafoli E. The transport of calcium across the inner membrane of mitochondrial. En: Carafoli E, ed. *Membrane transport of calcium*. London, Academic Press 1982; 109-139.
116. Siegel PKS, Cragoe EJ, Trumble MJ, Kaczorowski GJ. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in membrane vesicles and papillary muscle preparations from Guinea pig hearts by analogs of amiloride. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3238-3242.
117. Sowers JR, Zemel MB, Standley PR, Zemel PC. Calcium and hypertension. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 338-348.
118. Luft FC. Putative mechanism of blood pressure reduction induced by increases in dietary calcium intake. *Am J Hypertens* 1990; 3: 156S-160S.
119. McCarron DA, Morris CD, Young E, Roullet C, Drüeke T. Dietary calcium and blood pressure: modifying factors in specific populations. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 215S-219S.
120. Cutler JA, Brittain E. Calcium and Blood pressure. An epidemiologic perspective. *Am J Hypertens* 1990; 3: 137S-146S.
121. Zidek W, Vetter H. Calcium and primary hypertension. *Nephron* 1987; 47(Suppl1): 13-20.
124. Sempos C, Cooper R, Kovar MG, et al. Dietary calcium and blood pressure in the National Health and Nutrition Examination Surveys I and II. *Hypertension* 1986; 8: 1067-1074.
125. Witteman JCM, Willett WC, Stampfer MJ, et al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women. *Circulation* 1989; 80: 1320-1327.
126. Grobbee DE, Hofman A. Calcium supplementation lowers blood pressure in young mildly hypertensive subjects: a randomized, controlled trial. *Lancet* 1986; 2: 703-707.
127. Resnick LM, Müller FB, Laragh JH. Calcium-regulating hormones in essential hypertension: relation to plasma renin activity and sodium metabolism. *Ann Intern Med* 1986; 105: 649-654.

128. Kesteloot H, Geboers J. Calcium and blood pressure. *Lancet* 1982; 1: 813-815.
129. McCarron DA, Pingree PA, Rubin RJ, Gaucher SM, Molitch M, Krutzik S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak. *Hypertension* 1980; 2: 162-168.
130. Kesteloot H, Joossens JV. Relationship of dietary sodium, potassium, calcium, and magnesium, with blood pressure: Belgian interuniversity research on nutrition and health. *Hypertension* 1988; 12: 594-599.
131. Hvarfner A, Bergstrom R, Morlin C, Wide L, Ljunghall S. Relationships between calcium metabolic indices and blood pressure in patients with essential hypertension as compared with a healthy population. *J Hypertens* 1987; 5: 451-456.
132. Young EW, Morris CD, McCarron DA. Urinary excretion in essential hypertension. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 624-632.
133. Luft FC, Zemel MB, Sowers JA, Fineberg NS, Weinberger MH. Sodium bicarbonate and sodium chloride: effects of blood pressure and electrolyte homeostasis in normal and hypertensive man. *J Hypertens* 1990; 8: 663-670.
134. Lechi A, Lechi C, Bonadonna G, Sinigaglia D, Carradini P, Polignano R, et al. Increased basal and thrombin-induced free calcium in platelets of essential hypertensive patients. *Hypertension* 1987; 9: 230-235.
135. Hvarfner A, Larsson R, Mörlin C, Rastad J, Wide L, Akerström G, et al. Cytosolic calcium in platelets: relationships to blood pressure and indices of systemic calcium metabolism. *J Hypertens* 1988; 6: 71-77.
136. Haller H, Lenz T, Thiede M, Lüdersdorf M, Kribben A, Distler A. Platelet intracellular free calcium and hypertension. *J Clin Hypertens* 1987; 3: 12-19.
137. Pritchard K, Raine AEG, Ashley CC, Castell LM, Somers V, Osborn C, et al. Correlation of blood pressure in normotensive and hypertensive individuals with platelet but not lymphocyte intracellular free calcium concentrations. *Clin Sci* 1989; 76: 631-635.
138. Cooper R, Lipowski J, Ford E, Shamsi N, Feinberg H, Le Breton G. Increased membrane-bound calcium in platelets of hypertensive patients. *Hypertension* 1989; 13: 139-144.

Bibliografia

139. Astarie C, Levenson J, Simon A, Meyer P, Devynck M-A. Platelet cytosolic proton and free calcium concentrations in essential hypertension. *J Hypertens* 1989; 7: 485-491.
140. Touyz RM, Milne FJ, Reinach SG. Intracellular Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ and K^+ in platelets and erythrocytes of essential hypertensive patients: relation to blood pressure. *Clin Exp Hypertens A* 1992; 14: 1189-1209.
141. Le Quan Sang KH, Laude D, Devynck M-A. Platelet cytosolic free Ca^{2+} concentration and serotonin content in essential hypertension. *J Hypertens* 1987; 5: 237-240.
142. Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol* 1982; 243: H365-H370.
143. Bindels RJM, Van Der Broek LAM, Jongen MJM, Hackeng WHL, Lowik CWGM, Van Os CH. Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis. *Pflugers Arch* 1987; 408: 395-400.
144. Stern N, Lee DBN, Silis V, Beck FWJ, Deftos L, Manolagas SC, et al. Effects of high calcium intake on blood pressure and calcium metabolism in young SHR. *Hypertension* 1984; 6: 639-646.
145. McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1981; 3 (suppl I): I-162-I-173.
146. Ayachi S. Increased dietary calcium lowers blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 1979; 28: 1234-1238.
147. Lucas PA, Brown RC, Drüeke T, Lacour B, Metz JA, McCarron DA. Abnormal vitamin D metabolism, intestinal calcium transport, and bone calcium status in the spontaneously hypertensive rat compared with its genetic control. *J Clin Invest* 1986; 78: 221-227.
148. Schedl HP, Miller DL, Horst RL, Wilson HD, Natarajan K, Conway T. Intestinal calcium transport in the spontaneously hypertensive rat: response to calcium depletion. *Am J Physiol* 1986; 250: G412-G419.
149. Young EW, Patel SR, Hsu CH. Plasma $1,25(OH)_2D_3$ response to parathyroid hormone, cyclic adenosine monophosphate, and phosphorus depletion in the spontaneously hypertensive rat. *J Lab Clin Med* 1986; 108: 562-566.

Bibliografía

150. Kurtz TW, Portale AA, Morris RC Jr. Evidence for a difference in vitamin D metabolism between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 1986; 8: 1015-1020.
151. Young EW, Hsu CH, Patel S, Simpson RU, Komanicky P. Metabolic degradation and synthesis of calcitriol in spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1987; 252: E778-E782.
152. Hsu CH, Chen P-S, Smith DE, Yang C-S. Pathogenesis of hypercalciuria in spontaneously hypertensive rats. *Miner Electrolyte Metab* 1986; 12: 130-141.
153. McCarron DA, Shneidman RJ, Lee DM. Ca^{2+} defects in experimental hypertension: SHR renal response to chronic infusion of human PTH (1-34). *Kidney Int* 1987; 32 (suppl 22): s249-s253.
154. Bhalla RC, Webb RC, Singh D, Ashley T, Brock T. Calcium fluxes, calcium binding, and adenosine cyclic 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase activity in the aorta of spontaneously hypertensive and Kyoto Wistar normotensive rats. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 468-477.
155. Kwan C-Y, Belbeck L, Daniel EE. Abnormal biochemistry of vascular smooth muscle plasma membrane isolated from hypertensive rats. *Mol Pharmacol* 1980; 17: 137-140.
156. Aoki K, Yamashita K, Tomita N, Tazumi K, Hotta K. ATPase activity and Ca^{2+} binding ability of subcellular membrane of arterial smooth muscle in spontaneously hypertensive rat. *Jpn Heart J* 1974; 15: 180-181.
157. Shibata S, Kuchii M, Taniguchi T. Calcium flux and binding in the aortic smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat. *Blood vessels* 1975; 12: 279-289.
158. Webb RC, Bhalla RC. Altered calcium sequestration by subcellular fractions of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Cardiol* 1976; 8: 651-661.
159. Kwan CY, Daniel EE. Arterial muscle abnormalities of hydralazine treated spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1982; 82: 1878-1890.
160. Vasdev S, Thompson P, Triggle C, Fernandez P, Bolli P, Ananthanarayanan VS. Fura-2 used as a probe to show elevated intracellular free calcium in platelets of Dahl-sensitive rats fed a high salt diet. *Biochim Biophys Res Commun* 1988; 154: 380-386.

161. Oshima T, Young EW, Hermsmeyer K, McCarron DA. Modification of platelet and lymphocyte calcium handling and blood pressure dietary sodium and calcium genetically hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 151-158.
162. Oshima T, Young EW, McCarron DA. Abnormal platelet and lymphocyte calcium handling in prehypertensive rats. *Hypertension* 1991; 18: 111-115.
163. Bruschi G, Bruschi ME, Caroppo M, Orlando G, Pavarani C, Cavatorta A. Intracellular free $[Ca^{2+}]$ in circulating lymphocytes of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1984; 35: 535-542.
164. Young EW, Bukoski RD, McCarron DA. Calcium metabolism in experimental genetic hypertension. En: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. New York, NY: Raven Press, Publishers; 1990: 977-987.
165. McCarron DA, Morris CD. Blood pressure response to oral calcium in persons with mild to moderate hypertension: a randomized, double-blind placebo-controlled, crossover trial. *Ann Intern Med* 1985; 103:825-831.
166. Nowson C, Morgan T. Effect of calcium carbonate on blood pressure. *J Hypertens* 1986; 4(suppl 6): S673-S675.
167. Bierenbaum ML, Wolf E, Bisgeier G, Maginnis WP. Dietary calcium: a method of lowering blood pressure. *Am J Hypertens* 1988; 1: 149s-152s.
168. Bloomfield RL, Young LD, Zurek G, et al. Effect of oral calcium carbonate on blood pressure in subjects with mildly elevated arterial pressure. *J Hypertens* 1986; 4(suppl 5): S351-S354.
169. Strazzullo P, Siani A, Guglielmi S, et al. Controlled trial of long-term oral calcium supplementation in essential hypertension. *Hypertension* 1986; 8: 1084-1088.
170. Thomsen K, Nilas L, Christiansen C. Dietary calcium intake and blood pressure in normotensive subjects. *Acta Med Scand* 1987; 222: 51-56.
171. Siani A, Strazzullo P, Guglielmi S, Pacioni D, Giacco A, Iacone R, et al. Controlled trial of low calcium versus high calcium intake in mild hypertension. *J Hypertens* 1988; 6: 253-256.

Bibliografía

172. Cappuccio FP, Markandu ND, Singer DRJ, Smith SJ, Shore AC, MacGregor GA. Does oral calcium supplementation lower high blood pressure? A double blind study. *J Hypertens* 1987; 5: 67-71.
173. Van Beresteyn ECH, Schaafsma G, De Waard H. Oral calcium and blood pressure: a controlled intervention trial. *Am J Clin Nutr* 1986; 44: 883-888.
174. Nowson C, Morgan T. Effect of calcium carbonate on blood pressure in normotensive and hypertensive people. *Hypertension* 1989; 13: 630-639.
175. Whelton PK, Appel L, Charleston J, Dalcin AT, Ewart C, Fried L, et al. The effects of non-pharmacologic interventions on blood pressure of persons with high normal levels. *JAMA* 1992; 267: 1213-1220.
176. Kawasaki N, Matsui K, Ito M, Nakamura T, Yoshimura T, Ushijima H, et al. Effect of calcium supplementation on the vascular sensitivity to angiotensin II in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153: 576-582.
177. Morris CD, McCarron DA. Effect of calcium supplementation in an older population with mildly increased blood pressure. *Am J Hypertens* 1992; 5: 230-237.
178. Singer DRJ, Markandu ND, Cappuccio FP, Beynon GW, Shore AC, Smith SJ, et al. Does oral calcium lower blood pressure? A double-blind study. *J Hypertens* 1985; 3: 661-671.
179. Zoccali C, Mallamaci F, Delfino D, Ciccarelli M, Parlongo S, Iellamo D, et al. Long-term oral calcium supplementation in essential hypertension: a double-blind, randomized, crossover study. *J Hypertens* 1990; 4 (suppl 6): S676-S678.
180. Zoccali C, Mallamaci F, Delfino D, Ciccarelli M, Parlongo S, Iellamo D, et al. Double-blind, randomized, crossover trial of calcium supplementation in essential hypertension. *J Hypertens* 1988; 6: 451-455.
181. Resnick LM, Laragh JH. The hypotensive effect of short-term oral calcium loading in essential hypertension. *Clin Res* 1983; 31: 334A. Abstract.
182. Grobbee DE, Hofman A. Calcium supplementation lowers blood pressure in young mildly hypertensive subjects: a randomized, controlled trial. *Lancet* 1986; 2: 703-707.

Bibliografía

183. Belizan JM, Villar J, Pineda O, González AE, Sainz E, Garrera G, et al. Reduction of blood pressure with calcium supplementation in young adults. *JAMA* 1983; 249: 1161-1166.
184. Luft FC, Aronoff GR, Sloan RS, Fineberg NS, Weinberger MH. Short-term augmented calcium intake has no effect on sodium homeostasis. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39: 414-419.
185. Tabuchi Y, Ogihara T, Hashizume K, Saito H, Kumahara Y. Hypotensive effect of long-term oral calcium supplementation in elderly patients with essential hypertension. *J Clin Hypertens* 1986; 3: 254-262.
186. Lyle RM, Melby CL, Hyner GC, Edmondson JW, Miller JZ, Weinberger MH. Blood pressure and metabolic effects of calcium supplementation in normotensive white and black men. *JAMA* 1987; 257: 1772-1776.
187. Lasaridis AN, Kaisis CN, Zananiri KI, Syrganis CD, Tourkantoris AA. Oral calcium supplementation promotes renal sodium excretion in essential hypertension. *J Hypertens* 1987; 5: S307-S309.
188. Gilliland M, Zawada ET, McClung D, TerWee J. Preliminary report: natriuretic effect of calcium supplementation in hypertensive women over forty. *J Am Coll Nutr* 1987; 6: 139-143.
189. Vinson JA, Mazur T, Bose P. Comparison of different forms of calcium on blood pressure of normotensive young males. *Nutr Rep Int* 1987; 36: 497-505.
190. Takagi Y, Fukasa M, Takata B, Fujimi T, Fujita T. Calcium treatment of essential hypertension in elderly patients evaluated by 24 H monitoring. *Am J Hypertens* 1991; 4: 836-839.
191. Van Beresteijn ECH, Van Schaulk M, Schaafsma G. Milk: does it affect blood pressure? A controlled intervention study. *J Intern Med* 1990; 228: 477-480.
192. Buonopane GJ, Kilara A, Smith JS, McCarthy RD. Effect of skim milk supplementation on blood cholesterol concentration, blood pressure, and triglycerides in a free-living human population. *J Am Coll Nutr* 1992; 11: 56-67.
193. Belizan JM, Villar J, Zalzar A, Rojas L, Chan D, Bryce GF. Preliminary evidence of the effect of calcium supplementation on blood pressure in normal pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 146: 175-180.

Bibliografía

194. Villar J, Repke J, Belizan JM, Pareja G. Calcium supplementation reduces blood pressure during pregnancy: results of a randomized clinical trial. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 317-322.
195. López-Jaramillo P, Narváez M, Weigel RM, Yépez R. Calcium supplementation reduces the risk of pregnancy-induced hypertension in an Andes population. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 648-655.
196. López-Jaramillo P, Narváez M, Yépez R. Effect of calcium supplementation on the vascular sensitivity to angiotensin II in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 261-262. Letter.
197. Marya RK, Rathee S, Manrow M. Effect of calcium and vitamin supplementation on toxemia of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1987; 24: 38-42.
198. Belizan JM, Villar J, González L, Campodonica L, Berjel E. Calcium supplementation to prevent hypertensive disorders of pregnancy. *N Engl J Med* 1991; 325: 1389-1405.
199. Knight KB, Keith RE. Calcium supplementation on normotensive and hypertensive pregnant women. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 891-895.
200. Saito K, Sano H, Furata Y, Fukuzaki H. Effect of oral calcium on blood pressure response in salt-loaded borderline hypertensive patients. *Hypertension* 1989; 13: 219-226.
201. Saito K, Sano H, Furata Y, Yamonishi J, Omatsu T, Ito Y, et al. Calcium supplementation in salt-dependent hypertension. *Contrib Nephrol* 1991; 90: 25-35.
202. Weinberger MH, Wagner UL, Fineberg NS. The blood pressure effects of calcium supplementation in humans of known sodium responsiveness. *Am J Hypertens* 1993; 6: 799-805.
203. Lyle RM. Does baseline serum total calcium level influence the blood pressure response to calcium supplementation? A double-blind study. *Neth J Med* 1992; 41: 48-55.
204. Meese RB, González DG, Casparian JM, Ram CVS, Pak CYC, Kaplan NM. Failure of calcium supplements to relieve hypertension. *Am J Med Sci* 1987; 294: 219-224.

Bibliografía

205. Zemel MB, Gualdoni SM, Sowers JR. Reductions in total and extracellular water associated with calcium-induced natriuresis and the antihypertensive effect of calcium in blacks. *Am J Hypertens* 1988; 1: 70-72.
206. Zemel MB, Kraniak J, Standley PR, Sowers JR. Erythrocyte cation metabolism in salt-sensitive hypertensive blacks as affected by dietary sodium and calcium. *Am J Hypertens* 1988; 1: 386-392.
207. Ernst FA, Enwonwu CO, Francis RA. Calcium attenuates cardiovascular reactivity to sodium and stress in Blacks. *Am J Hypertens* 1990; 3: 451-457.
208. Friedman SM. Vascular reactivity. En: Genest J, Kuchel O, Hamet P, Cantin M, eds. *Hypertension: physiopathology and treatment*. New York: McGraw-Hill, 1983: 457-473.
209. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature Lond* 1993; 361: 315-325.
210. Pedersen OL, Christensen NJ, Ramsch KD. Comparison of acute effects of nifedipine in normotensive and hypertensive man. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980; 2: 357-366.
211. Frishman W, Charlap S, Kimmel B, Saltzberg S, Stroh J, Weinberg P, et al. Thrice daily administration of oral verapamil in the treatment of essential hypertension. *Arch Intern Med* 1986; 146: 561-565.
212. Robinson BF, Dobbs RJ, Bayley S. Response of forearm resistance vessels to verapamil and sodium nitroprusside in normotensive and hypertensivemen: evidence for a functional abnormality of vascular smooth muscle in primary hypertension. *Clin Sci* 1982; 63: 33-42.
213. Hulthen UI, Bolli P, Amann Fw, Kiowski W, Bühler FR. Enhanced vasodilatation in essential hypertension by calcium channel blockade with verapamil. *Hypertension* 1982; 4(Suppl II): II26-II31.
214. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282-293.
215. Mulvany MJ. Resistance vessel abnormalities in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: S656-S665.
216. Morano L, Gagelmann M, Arner A, Ganten U, Ruegg JC. Myosin isoenzymes of vascular smooth muscle and cardiac muscle in the

- spontaneously hypertensive and normotensive male and female rat: a comparative study. *Circ Res* 1986; 59: 456-462.
217. Bhalla RC, Sharma RV, Bendhack LM. Increased Ca^{2+} sensitivity of alpha1-adrenoceptor-mediated contraction in arterial smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. In: Aoki K, ed. *Calcium in essential hypertension*. New York: Academic Press, 1988: 334-358.
218. Aqel MB, Sharma RV, Bhalla RC. Increased Ca^{2+} sensitivity of alpha1-adrenoceptor-stimulated contraction in SHR caudal artery. *Am J Physiol* 1986; 250: C275-C282.
219. Bendhack LM, Sharma RV, Bhalla RC. Contractile response of spontaneously hypertensive rat caudal artery to phorbol esters. *Hypertension* 1988; 11(Suppl I): I-112-I-116.
220. Hatton DC, Scrogin KE, Levine D, Feller D, McCarron DA. Dietary calcium modulates blood pressure through an alpha-1 adrenergic mechanism. *Am J Physiol* 1993; 264: F234-F238.
221. Zidek W, Losse H, Dorst K, Zumkley H, Vetter H. Intracellular sodium and calcium in essential hypertension. *Klin Wochenschr* 1982; 60: 859-862.
222. Losse H, Zidek W, Vetter H. Intracellular sodium and calcium in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: 532-534.
223. Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Urabe H, Tsukakoshi M, Kasuya T, et al. The elevation of cytoplasmic calcium ions in vascular smooth muscle cells in SHR. Measurement of the free calcium ions in single living cells by laser microfluorometry. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 141: 340-345.
224. Bruschi G, Bruschi ME, Orlandini G, Cavatorta A, Borghetti A, Ferrandi M, et al. Why is $[Ca^{2+}]_i$ increased in blood cells in primary hypertension? *J Hypertens* 1985; 3(Suppl 3): S45-S47.
225. Bruschi G, Bruschi ME, Caroppo M, Orlandini G, Spaggiari M, Cavatorta A. Cytoplasmic free Ca^{2+} in platelets of spontaneously hypertensive rats and essential hypertensive patients. *Clin Sci* 1985; 66: 179-184.
226. Le Quan Sang KH, Devynck MA. Increased platelet cytosolic free calcium concentration in essential hypertension. *J Hypertens* 1986; 4: 567-574.

227. Lindner A, Kenny M, Meacham AJ. Effects of a circulating factor in patients with essential hypertension on intracellular calcium in normal platelets. *N Engl J Med* 1987; 316: 509-513.
228. Duggan J, Kilfeather S, Sheridan J, O'Brien E, O'Malley K. The effects of age on platelet intracellular calcium concentration in normotensives and hypertensives. *J Hypertens* 1991; 9: 845-850.
229. Dominiczak AF, Morton JJ, Murray G, Semple PF. Platelet cytosolic free calcium in essential hypertension: responses to vasopressin. *Clin Sci* 1989; 77: 183-188.
230. Tepel M, Wischniowski H, Neusser M, Spieker C, Zidek W. Effect of cytokines on cytosolic-free calcium in human platelets from essential hypertensives. *Am J Hypertens* 1993; 6: 660-666.
231. Shore AC, Beynon GW, Jones JC, Markandu ND, Sagnella GA, MacGregor GA, et al. Mononuclear leucocyte intracellular free calcium - does correlate with blood pressure? *J Hypertens* 1985; 3: 183-187.
232. Favre L, Lew PM, Valloton MB. Cytosolic free calcium and intracellular stores are normal in neutrophils from patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1985; 2 (Suppl 3): S483-S484.
233. Ashley CC, Castell LM, Ledingham JGG, Osborn C, Prichard K, Raine AEG, et al. Relationship between lymphocyte and platelet intracellular free calcium concentrations, plasma ionized calcium and blood pressure in essential hypertension. *J Physiol Lond* 1986; 372: 81P.
234. Noon JP, Rice PJ, Baldessarini RJ. Ca^{2+} leakage as a cause of the high resting tension in vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1605-1607.
235. Bond M, Shuman H, Somlyo AP, Somlyo AV. Total cytoplasmic calcium in relaxed and maximal contracted rabbit portal vein smooth muscle. *J Physiol Lond* 1984; 357: 185-201.
236. Meyer P, Marche P. Cell membranes in hypertension. *Am J Med Sci* 1988; 295: 396-399.
237. Koutouzov S, Remmal A, Marche P, Meyer P. Hypersensitivity of phospholipase C in platelets of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987; 10: 497-504.

Bibliografía

238. Aqel MB, Sharma RV, Bhalla RC. Increased norepinephrine sensitive intracellular Ca^{2+} pool in the caudal artery of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1987; 5: 249-253.
239. Postnov YV, Orlov SN, Pokudin NI. Decrease of calcium binding by the red blood cell membrane in spontaneously hypertensive rats and in essential hypertension. *Pflügers Arch* 1979; 379: 191-195.
240. Orlov SN, Postnov YV. Calcium accumulation and calcium binding by the cell membrane of cardiomyocytes and smooth muscle of aorta in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 1980; 59 (Suppl): 207s-209s.
241. Postnov YV, Orlov SN. Alteration on membrane control over intracellular calcium in essential hypertension and spontaneously hypertensive rats. En: Zumkley H, Losse H, eds. *Intracellular electrolytes and arterial hypertension*. Stuttgart, George Thieme Verlag 1980; 144-151.
242. Devinck MA, Pernollet MG, Nunez A, Meyer P. Analysis of calcium handling in erythrocyte membranes of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1981; 3: 397-403.
243. Wei JW, Janis RA, Daniel EE. Studies of subcellular fraction from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats: alteration in both calcium uptake and enzyme activities. *Blood Vessels* 1976; 13: 293-308.
244. Wei JW, Janis RA, Daniel EE. Alterations in calcium transport and binding by the plasma membranes of mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 1977; 14: 55-64.
245. Pernollet MG, Devinck MA, Meyer P. Abnormal calcium handling by isolated cardiac plasma membranes from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 1981; 61: 453-462.
246. Devinck MA, Pernollet MG, Nunez AM, Meyer P. Calcium binding alteration in plasma membrane from various tissues of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1981; 3: 797-808.
247. Postnov YV, Orlov SN. Evidence of altered calcium accumulation and calcium binding by the membranes of adipocytes in spontaneously hypertensive rats. *Pflügers Arch* 1980; 385: 85-89.
248. Forstner J, Manery P. Calcium binding by human erythrocyte membranes. *Biochem J* 1971; 124: 563-571.

Bibliografia

249. Forstner J, Manery P. Calcium binding by human erythrocyte membranes. Significance of carboxyl, amino and thiol groups. *Biochem J* 1971; 125: 343-352.
250. Postnov YV, Orlov SN. Ion transport across plasma membrane in primary hypertension. *Physiol Rev* 1985; 65: 904-945.
251. Postnov YV, Orlov SN, Reznikova MB, Rjazhsky GG, Pokudin NI. Calmodulin distribution and Ca^{2+} transport in the erythrocytes of patients with essential hypertension. *Clin Sci* 1984; 66: 459-463.
252. Orlov SN, Postnov YV. Ca^{2+} binding and membrane fluidity in essential and renal hypertension. *Clin Sci* 1982; 63: 281-284.
253. Orlov SN, Pokudin NI, Postnov YV. Calmodulin-dependent Ca^{2+} transport in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats. *Pflügers Arch* 1983; 397: 54-56.
254. Postnov YV, Orlov SN. Calmodulin-dependent Ca^{2+} transport across plasma membranes in primary hypertension. *J Hypertens* 1983; 1(Suppl 2): 9-10.
255. Cirillo M, David-Dufilho M, Devinck MA. Altered active sodium and calcium transport by heart sarcolemmal membranes from young spontaneously hypertensive rats: modulation by calmodulin. *J Hypertens* 1984; 2(Suppl 3): 485-487.
256. Vezzoli G, Elli AA, Tripodi G, Bianchi G, Carafoli E. Calcium ATPase in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats of the Milan strain. *J Hypertens* 1985; 3: 645-648.
257. Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am J Physiol* 1977; 232: C165-C173.
258. Bianchi G, Ferrari P, Trizio D, et al. Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in the rat. *Hypertension* 1985; 7: 319-325.
259. Cirillo M, Galletti F, Corrado MF, Strazzullo P. Disturbances of renal and erythrocyte calcium handling in rats of the Milan hypertensive strain. *J Hypertens* 1986; 4: 443-449.

Bibliografía

260. Kwan CY, Triggle CR, Grover AK, Daniel EE. Subcellular membrane properties in vascular and non-vascular smooth muscles of Dahl hypertensive rats. *J Hypertens* 1986; 4: 49-55.
261. Garay RP, Garrahan PJ. The interaction of adenosinotriphosphate and inorganic phosphate with the sodium pump in red cells. *J Physiol* 1975; 249: 51-67.
262. Dagher G, Amar M, Khefif A. Red blood cells Ca^{2+} pump is not altered in essential hypertension of humans and Kyoto rats. *Biochim Biophys Acta* 1987; 903: 218-228.
263. Orlov SN, Pokudin NI, Postnov YV. Calcium transport in erythrocytes of rats with spontaneous hypertension. *J Hypertens* 1988; 6: 829-837.
264. Oshima T, Young EW, Bukoski RD, McCarron DA. Abnormal calcium handling by platelets of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 15: 606-611.
265. Olorunsogo OO, Okudolo BE, Lawal SOA, Falase AO. Erythrocyte Ca^{2+} -pumping of hypertensive humans: reduced stimulation by calmodulin. *Bioscience Rep* 1985; 5: 525-531.
266. Resinck TJ, Tkachuk VA, Erne P, Bühler FR. Platelet membrane calmodulin-stimulated calcium-adenosine triphosphatase. Altered activity in essential hypertension. *Hypertension* 1986; 8: 159-166.
267. Vincenzi FF, Morris CD, Kinsel LB, Kenny M, McCarron DA. Decreased calcium pump adenosine triphosphatase in red blood cells of hypertensive subjects. *Hypertension* 1986; 8: 1058-1066.
268. Vincenzi FF. The pharmacology of calmodulin antagonism: a reappraisal. En: Kakiuchi S, Hidaka H, Means A, eds. *Calmodulin and intracellular Ca^{2+} receptors*. New York, Plenum Medical 1982; 1-17.
269. Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1997; 157:2413-2446
270. Jimenez W, Gutkowska J, Ginés P, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Molecular forms and biological activity of atrial natriuretic factor in patients with cirrhosis and ascites. *Hepatology* 1991; 14: 601-607.

271. Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, Weyman A. The Committee on M-Mode Standardization of the American Society of Echocardiography: recommendations regarding in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58: 1072-1083.
272. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass: anatomic validation of the method. *Circulation* 1977; 55: 613-618.
273. Dixon WJ, Brown MB, Engelman L. *BMDP Statistical Software*. Berkeley, University of California Press, 1985.
274. Lindner A, Gagne ER, Zingraff J, Jungers P, Drueke TB, Hannaert P, Garay R. A circulating inhibitor of the RBC membrane calcium pump in chronic renal failure. *Kidney Int* 1992; 42: 1328-1331.
275. Lindner A, Vanholder R, De Smet R, Hinds TR, Vogeleere P, Sandra P, Foxall P, Ringoir S. HPLC fractions of human uremic plasma inhibit the RBC membrane calcium pump. *Kidney Int* 1997; 51: 1042-1052.