

Universidad Católica de Santa María
Escuela de Postgrado
Doctorado en Ciencias Biomédicas



**ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA ADRENÉRGICA DEL MÚSCULO LISO
VASCULAR, POR EFECTO DE SU INCUBACIÓN CON ÓXIDO NITROSO EN
RATAS CON DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EXPERIMENTAL**

Tesis presentada por la Maestra:
**Corzo Salas de Valdivia, Angélica
Magdalena**

Para optar el Grado Académico de:
Doctora en Ciencias Biomédicas

Asesor:
Dr. Paz Aliaga Azael

Arequipa – Perú
2022

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 22 de Abril del 2022

Dietamen: 001085-C-EPG-2022

Visto el borrador del expediente 001085, presentado por:

2005000212 - CORZO SALAS DE VALDIVIA ANGELICA MAGDALENA

Título:

**ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA ADRENÉRGICA DEL MÚSCULO LISO VASCULAR, POR EFECTO
DE SU INCUBACIÓN CON ÓXIDO NITROSO EN RATAS CON DISFUNCIÓN ENDOTELIAL
EXPERIMENTAL**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**0190 - CHOCANO ROSAS DE VIZCARRA TERESA JESUS
DICTAMINADOR**



**1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO
DICTAMINADOR**



**1072 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR
DICTAMINADOR**



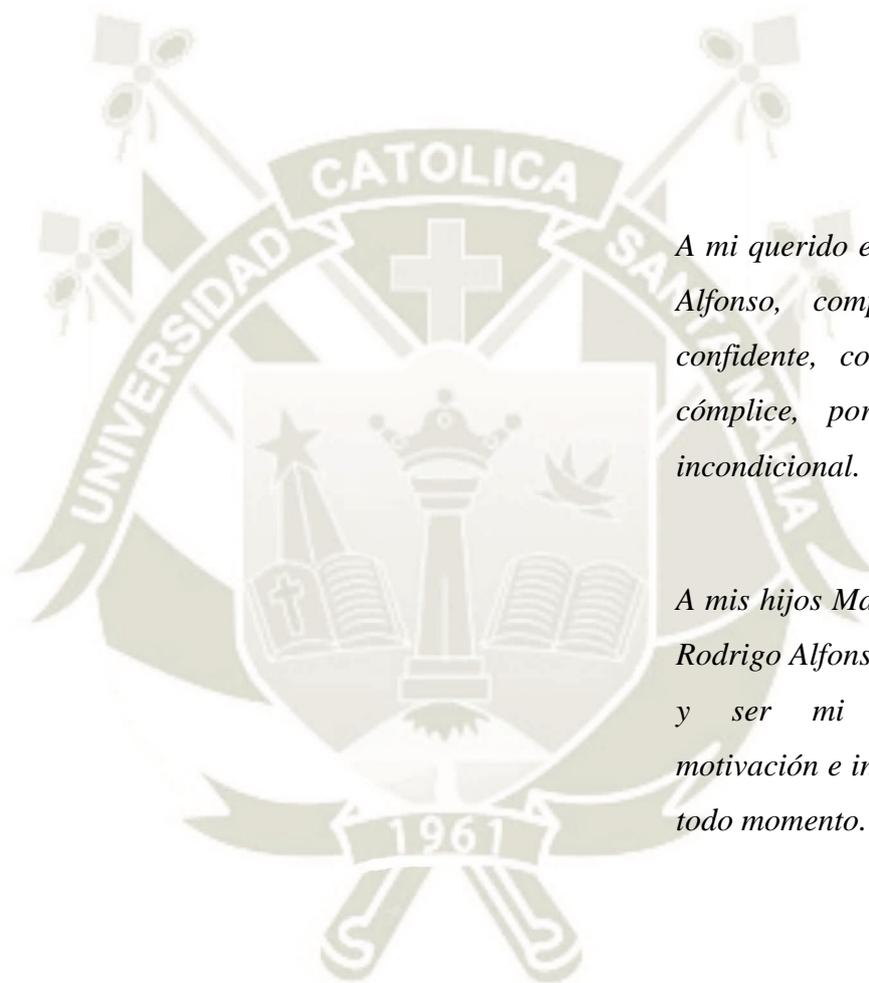
**1301 - FARFAN DELGADO MIGUEL FERNANDO
DICTAMINADOR**



**6005 - BELTRAN MOLINA ROSA PATRICIA
DICTAMINADOR**



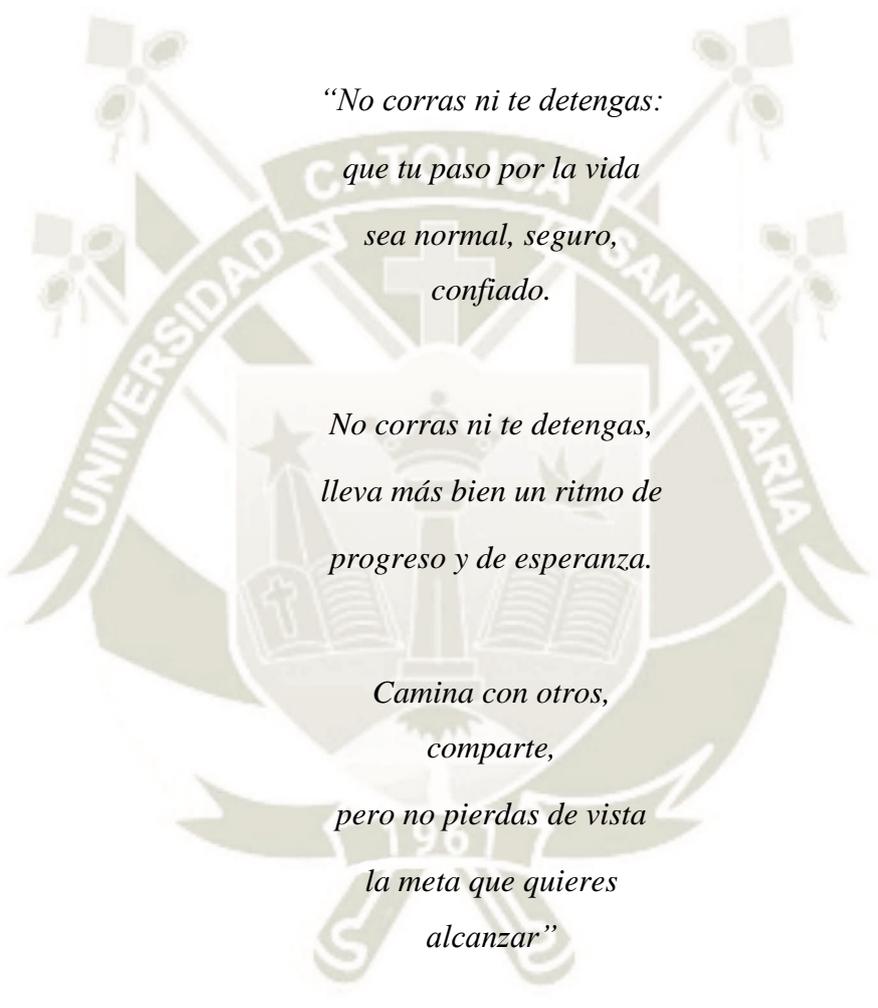
Dedicatoria



A mi querido esposo Víctor Alfonso, compañero fiel, confidente, colaborador y cómplice, por su apoyo incondicional.

A mis hijos María Gracia y Rodrigo Alfonso, por existir y ser mi fuente de motivación e inspiración en todo momento.

Epígrafe



*“No corras ni te detengas:
que tu paso por la vida
sea normal, seguro,
confiado.*

*No corras ni te detengas,
lleva más bien un ritmo de
progreso y de esperanza.*

*Camina con otros,
comparte,
pero no pierdas de vista
la meta que quieres
alcanzar”*

DR. JAIME ESTRUCH ARGELAGA

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	ii
Epígrafe	iii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Sistema nervioso autónomo	4
1.1.1. Sustancias vasoconstrictoras.....	6
1.1.1.1. Noradrenalina	6
1.1.1.2. Tromboxano A ₂	6
1.1.1.3. Serotonina.....	7
1.2. Actividad del músculo liso vascular	8
1.3. Función endotelial.....	11
1.3.1. Receptores.....	13
1.3.2. El neurotransmisor acetilcolina (ACh)	18
1.3.3. Factores endoteliales.....	20
1.3.4. Disfunción endotelial.....	21
1.3.5. Niveles de alteración endotelial.....	22
1.3.6. Hipercolesterolemia y arterosclerosis.....	22
1.3.7. Otros marcadores de disfunción endotelial	24

1.3.7.1. Estrés oxidativo	24
1.4. Presión arterial	28
1.4.1. Factores que determinan la presión arterial	28
1.4.2. Hipertensión arterial	28
1.4.3. Epidemiología.....	29
1.4.4. Fisiopatología de la hipertensión	31
1.4.4.1. Alteraciones vasculares: endotelio y musculo liso vascular.....	31
1.5. Óxido nítrico (NO).....	32
1.5.1. Fuentes farmacológicas y endógenas del óxido nítrico	34
1.5.2. Mecanismo de acción	35
1.5.3. Déficit de la síntesis endógena del óxido nítrico	36
1.6. Óxido nitroso N ₂ O.....	37
1.6.1. Origen	37
1.6.2. Química.....	38
1.6.3. Farmacocinética.....	38
1.6.4. Usos Clínicos	39
1.6.5. Efectos psicológicos y fisiológicos.....	39
1.6.6. Receptores Adrenérgicos	40
1.6.7. Subfamilias de Receptores Adrenérgicos	40
1.6.8. Receptores Beta Adrenérgicos.....	41
1.7. Antecedentes de la Investigación	42
CAPÍTULO II.....	53
2. METODOLOGÍA	53
2.1. Tipo de estudio.....	53
2.2. Muestra.....	53

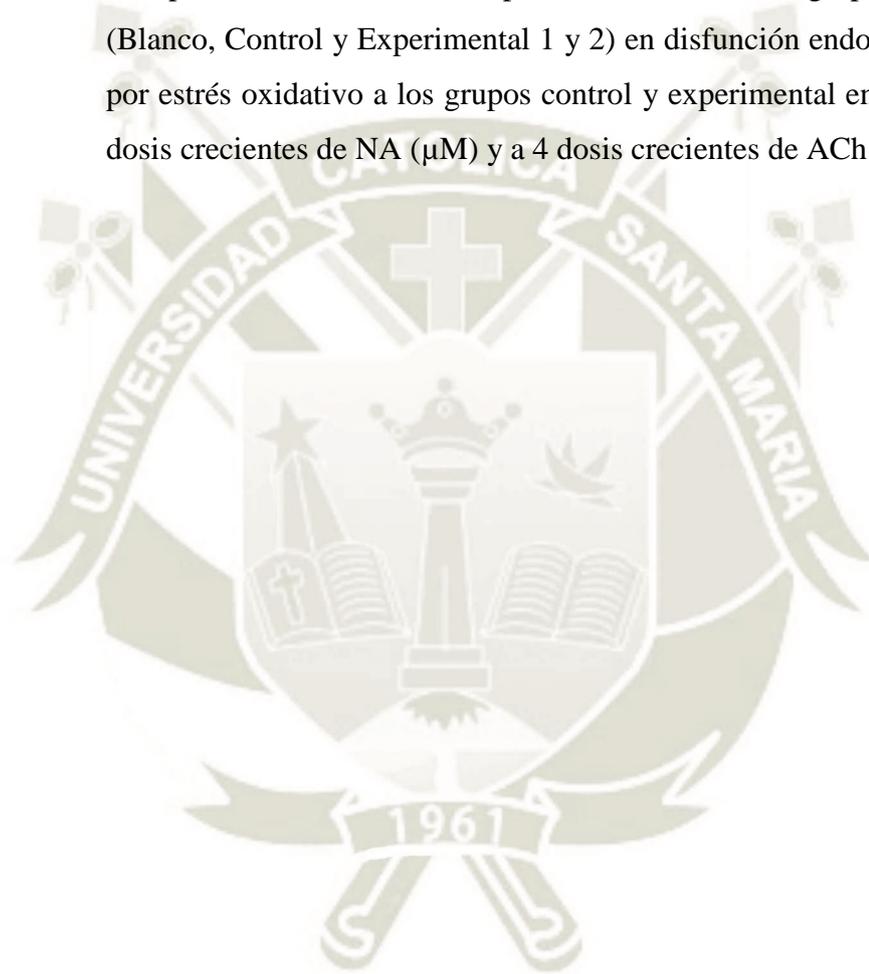
2.2.1. Unidades de Estudio	53
2.2.2. Muestra biológica	54
2.2.3. Muestra de estudio	55
2.3. Tiempo y duración del estudio	55
2.4. Lugar de Experimentación	55
2.5. Recursos e Instrumentos	55
2.5.1. Recursos humanos	55
2.5.2. Recursos materiales	56
2.5.3. Recursos financieros	57
2.6. Diseño Experimental	57
2.6.1. Inducción de hiperglucemia en un modelo murino experimental	57
2.6.2. Determinación de Glicemia	57
2.6.2.1. Determinación de Glucosa en Suero	58
2.6.3. Determinación del marcador de oxidación: malondialdehído (MDA)	59
2.6.4. Obtención de la respuesta vasoactiva en anillos aislados de aorta torácica	59
2.6.4.1. Empleo de la cámara de órganos aislados	59
2.7. Diseño Estadístico	63
CAPÍTULO III	64
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
3.1. Resultados	64
3.1.1. Inducción de hiperglucemia mediante la administración en una sola dosis de estreptozotocina (STZ) en ratas, observado 7 días después de injuriado el tejido pancreático	64
3.1.2. Determinación malondialdehído (MDA) sérico como marcador de estrés oxidativo resultado de la inducción de hiperglucemia	67

3.1.3. Determinación de los parámetros fisiológicos de vasoconstricción con noradrenalina (NA) y vasodilatación con acetilcolina (ACh) en anillos aislados de aorta torácica de ratas del grupo blanco.....	69
3.1.4. Inducción de disfunción endotelial resultado del estrés oxidativo observado a través de la respuesta vasoactiva (vasoconstricción y vasodilatación) de anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas hiperglucémicas del grupo control.....	72
3.1.5. Respuesta vasoconstrictora de anillos de aorta con disfunción endotelial previamente incubados con óxido nitroso (N ₂ O).....	75
3.1.5.1. Efecto frente a 03 dosis crecientes de noradrenalina.....	75
3.1.5.2. Efecto frente a 03 dosis crecientes de fenilefrina como agonista α -adrenérgico	78
3.1.6. Comparación de la respuesta vasoactiva de los grupos estudiados	81
3.2. Discusión.....	86
CONCLUSIONES.....	91
RECOMENDACIONES	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS.....	98

Índice de tablas

Tabla N° 1:	Sustancias endógenas vasoactivas y sus receptores presentes en las células de músculo liso vascular	10
Tabla N° 2:	Valores de presión arterial sistémica. Valores que corresponden a la presión arterial sistólica (PAS) / presión arterial diastólica (PAD) para adultos mayores	29
Tabla N° 3:	Predominio y función de los subtipos de receptores beta adrenérgicos en diversos órganos y tejidos del organismo.....	42
Tabla N° 4:	Comparación de los niveles de glucemia basal (mM/l) con los del primer y sétimo día de injuriar con estreptozotocina (STZ) el tejido pancreático de ratas a los grupos control y experimental.....	65
Tabla N° 5:	Niveles séricos de malondialdehído (MDA) (nM/ml) después de injuriar el tejido pancreático de ratas con estreptozotocina (STZ) a los grupos control y experimental	68
Tabla N° 6:	Patrón de vasoconstricción y vasodilatación empleando 3 dosis crecientes de noradrenalina (NA) y 4 dosis crecientes de acetilcolina (ACh) respectivamente en anillos aórticos procedentes de ratas del grupo blanco.....	71
Tabla N° 7:	Dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (µM) y de 4 dosis crecientes de ACh (µM) sobre anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Control.....	73
Tabla N° 8:	Dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (µM) y a 4 dosis crecientes de ACh (µM) en anillos aislados de aorta procedentes del grupo experimental 1 después de la incubación con óxido nítrico.....	76

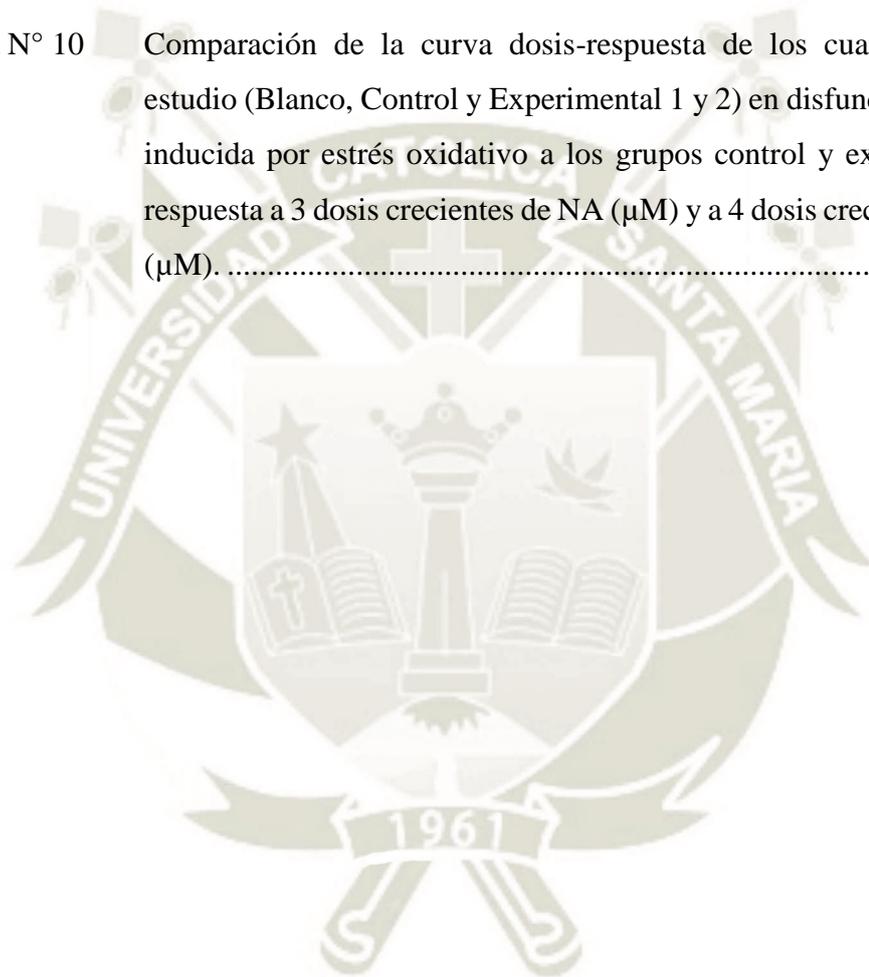
- Tabla N° 9: Dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Experimental 2 después de la incubación con óxido nitroso.....79
- Tabla N° 10: Comparación de la dosis-respuesta de los cuatro grupos de estudio (Blanco, Control y Experimental 1 y 2) en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo a los grupos control y experimental en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM).83



Índice de figuras

Figura N° 1	Función endotelial	11
Figura N° 2	Clasificación de los receptores adrenérgicos, se remarca en color azul los receptores beta adrenérgicos, tema de estudio de este trabajo (Tomado y modificado de Woodcock (31)).....	41
Figura N° 3	Diseño experimental.....	62
Figura N° 4	Comparación de los promedios de glucemia basal (mM/l) con los del primer y sétimo día de injuriar con estreptozotocina (STZ) el tejido pancreático de ratas a los grupos control y experimental.....	66
Figura N° 5	Promedio de malondialdehído (MDA) (ηM/ml) sérico después de injuriar el tejido pancreático de ratas con estreptozotocina (STZ) a los grupos control y experimental.....	69
Figura N° 6	Curva dosis-respuesta del patrón de contracción y relajación fisiológico empleando 3 dosis crecientes de noradrenalina (NA) y 4 dosis crecientes de acetilcolina (ACh) respectivamente en anillos aórticos procedentes de ratas del grupo blanco.	72
Figura N° 7	Curva dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y de 4 dosis crecientes de ACh (μM) sobre anillos aislados de aorta procedentes del grupo control	75
Figura N° 8	Curva dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Experimental 1 después de la incubación con óxido nitroso ...	78

- Figura N° 9 Curva dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de FE de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Experimental 2 después de la incubación con óxido nítrico.....81
- Figura N° 10 Comparación de la curva dosis-respuesta de los cuatro grupos de estudio (Blanco, Control y Experimental 1 y 2) en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo a los grupos control y experimental en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM).85



Lista de abreviaturas

β AR	Receptor beta adrenérgico
5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato Ciclasa
ACP	Arterias coronarias porcinas
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
AMI	Arterias mamarias internas humanas
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ATP	Adenosin trifosfato
Ca ₂₊	Calcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalasa
CaV	Canales de Ca ₂₊ dependientes de voltaje
CDR	Curvas dosis respuestas
CE50	Concentración efectiva 50
CMLV	Células del musculo liso vascular
COXs	Ciclooxigenasas
DAG	Diacilglicerol
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
E _{max}	Efecto máximo
ENU	Etil nitroso urea
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno

ET	Endotelina
ENU	Etil nitroso urea
FC	Frecuencia cardiaca
Fen	Fenilefrina
GC	Gasto cardiaco
GCs	Guanilato Ciclasa Soluble
GGFI	Índice de Aptitud Funcional General
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HA	Hipertensión arterial
HERF1	Factor regulador del intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ 1
IGF-I	Hormona que regula los efectos de la hormona del crecimiento en el cuerpo
IP ₃	Inositol trifosfato
ISO	Isoproterenol
KCl	Cloruro de potasio
KO	knockout
L-NAME	Éster metílico de la N -nitro-L-arginina
MAGI-3	Guanilato ciclasa invertida asociada a membrana 3
MaxiK	Canales de potasio activados por calcio
MDA	Malondialdehído
MLC20	Cadena Ligera de la Miosina
MLV	Musculo liso vascular
MO	Médula ósea
mTOR	Quinasa clave que actúa por debajo de PI3K
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Oxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS1	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible
NOS3	Óxido nítrico sintasa endotelial

NOx	Término genérico que hace referencia a un grupo de gases muy reactivos que contienen nitrógeno y oxígeno en diversas proporciones
ONOO	Peroxinitrito
PA	Presión Arterial
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión Arterial Sistólica
PGE2	Prostaglandina E2
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PKC	Proteína quinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PUFAs	Ácidos grasos poli-insaturados
RP	Resistencia vascular periférica
RS	Retículo sarcoplasmico
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
ST	Período isoelectrico cuando los ventrículos se encuentran entre la despolarización y la repolarización
TEA	Tetraetilamonio
TP	Receptor
TP TXA ₂	Tromboxano A ₂
VOCC	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la influencia de la administración de óxido nítrico sobre la capacidad constrictora de la noradrenalina sobre el músculo liso vascular aórtico, en ratas con estrés oxidativo desencadenado por la hiperglucemia en un modelo experimental de diabetes mellitus inducida con estreptozotocina promoviendo en consecuencia disfunción endotelial. Se evaluaron la glucemia, el indicador de estrés oxidativo malondialdehído (MDA) y la respuesta vasorreactiva de anillos aislados de aorta torácica. El estudio se realizó con los anillos aórticos aislados de 20 ratas de especie *Rattus norvegicus* variación albinus línea Sprague-Dawley, que se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (n=5 cada uno): Blanco, sin inducción de hiperglucemia se obtuvieron los valores referenciales (normales) de vasoconstricción y vasorelajación; Control, con hiperglucemia se obtuvieron las respuestas vasoactivas disfuncionantes; Experimental 1, con hiperglucemia más óxido nítrico se indujo la vasoconstricción con noradrenalina; Experimental 2, con hiperglucemia más óxido nítrico se indujo la vasoconstricción con fenilefrina. Para el estudio experimental con enfoque cuantitativo, se indujo la contracción vascular con 3 dosis crecientes de noradrenalina (0,1, 1,0 y 10,0 μM) mientras que, la respuesta vasorelajante se realizó con 4 dosis crecientes de acetilcolina (0,01, 0,1, 1,0 y 10,0 μM). Para el análisis estadístico se calculó el estadístico F de Friedman y la prueba Post Hoc de Bonferroni de Kruskal-Wallis, considerando un nivel de significancia del 95%. Se observó un incremento significativo en la respuesta vasoconstrictora a la noradrenalina en el grupo Experimental 1 (116,14 %) en comparación con los grupos Blanco (100%) y Control (106,14) ($p < 0,01$). Lo que demostró que la incubación con óxido nítrico a la concentración de 300pp/millón fue el responsable de tal efecto. Resultado similar (significativo) se obtuvo con el grupo Experimental 2 (116,70%) donde se indujo la vasoconstricción con fenilefrina demostrando con ello, que la influencia del óxido nítrico no solamente fue con sustratos adrenérgicos endógenos sino también con los simpático miméticos exógenos como la fenilefrina. En conclusión, el óxido nítrico actuaría tal vez estimulando a los receptores alfa adrenérgicos y en consecuencia incrementando la disfunción endotelial resultado del estrés oxidativo.

Palabras clave: Respuesta adrenérgica, noradrenalina, músculo liso vascular, óxido nítrico, ratas, disfunción endotelial.

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to determine the influence of the administration of nitrous oxide on the constricting capacity of norepinephrine on the aortic vascular smooth muscle in rats with oxidative stress triggered by hyperglycemia in an experimental model of diabetes mellitus induced with streptozotocin, hence promoting the endothelial dysfunction. Glycemia, the malondialdehyde (MDA) oxidative stress indicator, and the vasoreactive response of isolated rings of the thoracic aorta were assessed. The study was carried out with the isolated aortic rings from 20 rats of the *Rattus norvegicus* species, albinus variation, Sprague-Dawley line, which were randomly divided into four groups (n=5 each): Blank, without hyperglycemia induction, to obtain reference (normal) values of vasoconstriction and vasorelaxation; Control, with hyperglycemia, to obtain dysfunctional vasoactive responses; Experimental I, with hyperglycemia plus nitrous oxide, to induce vasoconstriction with norepinephrine; Experimental II, with hyperglycemia plus nitrous oxide, to induce vasoconstriction with phenylephrine. For the experimental study with a quantitative approach, vascular constriction was induced with 3 increasing doses of norepinephrine (0.1, 1.0, and 10.0 μM), while the vasorelaxative response was achieved with 4 increasing acetylcholine doses (0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 μM). For the statistical analysis, the Friedman F statistic was calculated and the post hoc Bonferroni Kruskal-Wallis test was carried out, considering a significance level of 95%. A significant increase was seen in the vasoconstriction response to norepinephrine in the Experimental I group (116.14%) compared to the Blank (100%) and Control (106.14) groups ($p < 0.01$). This demonstrated that the incubation with nitrous oxide at a 300pp/million concentration was responsible for such effect. A similar (significant) result was obtained with the Experimental II group (116.70%) where vasoconstriction was induced by phenylephrine, thus demonstrating that the influence of nitrous oxide not only occurs with endogenous adrenergic substrates but also with exogenous sympathetic mimetic substrates such as phenylephrine. In conclusion, nitrous oxide may act by stimulating adrenergic alpha receptors and consequently enhancing the endothelial dysfunction as a result of oxidative stress.

Keywords: Adrenergic response, norepinephrine, vascular smooth muscle, nitrous oxide, rats, endothelial dysfunction.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación demuestra la influencia del tratamiento con óxido nitroso (incubación) como anestésico frente a la vasoconstricción promovida por la noradrenalina sobre anillos aislados de aorta torácica. Por su parte, la respuesta vasodilatadora de los anillos aislados aórticos se indujo con acetilcolina (ACh). El campo de la investigación corresponde a Ciencias Biomédicas, área de farmacología y la línea de anestésicos.

La causa principal de esta investigación surge frente a la pregunta ¿Si, la sedación con el óxido nitroso tiene algún efecto adicional en pacientes con endotelio vascular disfuncionante como en las patologías cardiovasculares tales como la hipertensión arterial? Los resultados de su estudio y comprensión del mismo, se tornan fundamentales para saber manejar el procedimiento anestésico durante la fase operatoria.

Esta investigación tiene como justificación el aumento en plasma de un sustrato simpático mimético como la noradrenalina, por ejemplo, observado en la hipertensión, conduciría a un incremento aun mayor de su efecto vasoconstrictor en el acto quirúrgico cuando se emplea el óxido nitroso como anestésico.

Debido al incremento en cirugías menores del uso del anestésico óxido nitroso en la sedación estomatológica y considerando los resultados del presente trabajo se espera que el cirujano dentista, deberá tomar las precauciones necesarias para su empleo especialmente en pacientes con disfunción endotelial producto de patologías como; hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes, enfermedad cardiovascular, etc. en donde hoy se sabe que en esos pacientes, la respuesta a la estimulación de sus receptores tanto alfa como beta adrenérgicos se encuentra alterada.

Dentro de las limitaciones se tuvo la infraestructura, la cual se tuvo que trabajar en las instalaciones del CIDEC-UNSA, cuyo instrumental a pesar de su antigüedad permitió el logro de los objetivos planteados. Además, el alcance de la presente investigación fue explicativo, brindado un aporte científico a los profesionales odontólogos y anesthesiólogos.

Para un abordaje más eficiente de la problemática, el presente trabajo de investigación, presenta una estructura de tres capítulos, el primero de los cuales es el Marco Teórico, en el que se realiza el desarrollo y análisis de los fundamentos teóricos del problema de estudio (conocimiento del arte) presentando las diferentes teorías acerca de la disfunción, drogas adrenérgicas al igual que el análisis de los antecedentes de la presente investigación.

El segundo capítulo trata sobre la Metodología, en el que se describen las estrategias metodológicas para el tratamiento de la información ya que, esta investigación se encuentra circunscrita en el diseño cuantitativo (observación experimental). Al desarrollar la investigación de laboratorio se tuvo como limitante el acceso a la infraestructura debido a las restricciones obligatorias por la pandemia, COVID-19.

En el tercer capítulo, se encuentran los Resultados y Discusión, se realiza la presentación de los resultados obtenidos en esta investigación y se lleva a cabo un contraste con los resultados de investigaciones recientes, que hacen referencia a la problemática y los conocimientos científicos que se tienen al respecto.

Finalmente se presentan las conclusiones, de igual manera, las recomendaciones, referencias bibliográficas y anexos pertinentes.

Angélica Magdalena Corzo Salas de Valdivia.

HIPÓTESIS

Es probable que el incremento de la respuesta vasoconstrictora a la noradrenalina se debería a la incubación previa con óxido nitroso de los anillos aórticos de ratas con disfunción endotelial.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el incremento de la capacidad vasoconstrictora de reacción del músculo liso vascular a la noradrenalina, por la administración de óxido nitroso en ratas con disfunción endotelial

Objetivos Específicos

1. Desarrollar el modelo experimental de inducción de hiperglucemia al administrar estreptozotocina (STZ) en ratas observado 7 días después de injuriado el tejido pancreático.
2. Demostrar la presencia de estrés oxidativo resultado de la inducción de hiperglucemia mediante, la determinación en plasma de malondialdehído (MDA) como marcador de oxidación.
3. Determinar los parámetros fisiológicos de vasoconstricción con 3 dosis de noradrenalina y 4 dosis de vasodilatación con acetilcolina (respuesta vasoactiva) con anillos aislados de aorta torácica de ratas normales (Grupo Blanco).
4. Demostrar la existencia de disfunción endotelial resultado del estrés oxidativo a través de la observación del deterioro (disminución) de la vasodilatación de anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas hiperglucémicas (Grupo Control).
5. Calcular la magnitud de la respuesta vasoconstrictora de anillos de aorta con disfunción endotelial incubados con óxido nitroso (N_2O) en respuesta a la administración al baño de órganos de 3 dosis crecientes tanto de noradrenalina como de fenilefrina como agonista α -adrenérgico.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Sistema nervioso autónomo

Las neuronas postganglionares simpáticas inervan los órganos que participan en el funcionamiento del sistema cardiovascular, y de igual forma a gran parte de los vasos sanguíneos, las glándulas adrenales, el corazón y el riñón. Al estimular el sistema nervioso simpático, se genera un efecto cronotrópico e inotrópico favorable en el corazón, incrementando la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca. La estimulación simpática en los vasos sanguíneos sistémicos, provoca un efecto vasoconstrictor que se ve reflejado en un incremento de las resistencias periféricas totales. Este efecto sobre el corazón y sobre las resistencias periféricas, que han sido generadas por la activación simpática produce un repunte de la presión arterial. Por otro lado, se presenta una descarga tónica de las fibras eferentes simpáticas que ocasiona la constricción tónica en los vasos de resistencia. Este tono simpático basal va a mantener contraídas, en cierta medida, casi todas las arteriolas sistémicas, que termina generando un aumento de la vasoconstricción por el incremento de la actividad simpática o por un efecto vasodilatador, originada por una inhibición simpática que se ha disminuido por los agentes vasodilatadores. Por este motivo, su rol en la regulación del tono vascular es primordial (1).

El sistema simpático y el parasimpático van modulando las funciones inotrópicas y cronotrópicas del corazón y el tono vascular mediante la interacción de receptores específicos. Los receptores de noradrenalina que intervienen, son los receptores α -adrenérgicos y β -adrenérgicos, de igual manera intervienen los receptores colinérgicos y adrenérgicos que conforman el primer escalón del señalamiento celular. Las terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares que inervan los distintos órganos diana, incluidos los vasos sanguíneos, son mayormente, fibras adrenérgicas que están liberando noradrenalina. La noradrenalina que ha sido liberada por las terminaciones nerviosas adrenérgicas, así como la noradrenalina y la

adrenalina circulantes, se unirán a receptores adrenérgicos específicos mediante los cuales ejercen sus acciones en los diferentes órganos diana. El sistema nervioso simpático también es partícipe en el remodelado ventricular y en la hipertrofia ventricular (1).

La unión ligando receptor de la noradrenalina con sus receptores origina la activación de vías intracelulares que modifican, integran y transducen las señales del exterior. En consecuencia, las señales autonómicas son reguladas por intermedio de los receptores de la superficie celular y se modulan en numerosos puntos de las vías efectoras (1). La modulación del tono vascular actúa sobre los receptores α adrenérgicos, los mismos que son prioritarios en los cambios de presión. La familia de los receptores adrenérgicos que participan pertenece a los receptores α -adrenérgicos, las isoformas de los receptores son los $\alpha 1$ y $\alpha 2$ adrenérgicos, receptores que participan en la modulación del tono vascular (1).

La noradrenalina, ubicada en el endotelio, se une a sus receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos, los que se encuentran acoplados a proteínas G_i que inactiva a la adenilato ciclasa (AC), lo cual genera una disminución del segundo mensajero intracelular adenosin monofosfato cíclico (AMPc), lo cual facilita la apertura de canales de K^+ dependientes de voltaje (2). Respecto a las células del MLV, la noradrenalina tiene interacción con los receptores $\alpha 1$ - adrenérgicos, receptores que se encuentran acoplados a proteínas G_q , seguidamente, éstos propician la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5- trifosfato (IP3) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). El DAG estimula la proteína cinasa C (PKC), que toma parte en la sensibilización al calcio (Ca^{2+}) segundo mensajero que es partícipe en la maquinaria contráctil, mientras que el IP3 ayuda en la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) mediante la activación del receptor IP3 que está ubicado en el mismo. El incremento de los porcentajes de Ca^{2+} intracelular, provoca que el Ca^{2+} se adhiera a la cadmodulina (CaM) formando el complejo Ca^{2+} -CaM, dicho complejo se une a la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), lo cual favorece a la contracción muscular (3).

1.1.1. Sustancias vasoconstrictoras

1.1.1.1. Noradrenalina

La adrenalina y la noradrenalina, hormona y neurotransmisor respectivamente, se sintetizan a partir de la L-tirosina, por dos fuentes en el organismo: las terminaciones nerviosas simpáticas, que desprenden noradrenalina sobre los órganos efectores posterior a la estimulación, y las células cromafines de la medula suprarrenal, que son las neuronas simpáticas postganglionares y fuentes de síntesis, almacén y liberación de adrenalina y noradrenalina bajo la estimulación de los receptores nicotínicos de acetilcolina. Ambas catecolaminas regulan respuestas fisiológicas tales como el metabolismo, la vasoconstricción, la vasodilatación, la proliferación y la presión sistólica/diastólica. La noradrenalina y la adrenalina que se liberan en situaciones de estrés, ansiedad e incremento de la presión, estas catecolaminas son mediadas por hormonas como histamina, Ang II y bradicinina.

Los receptores a noradrenalina son receptores metabotrópicos, estos son receptores α y β - adrenérgicos que están acoplados a proteínas G, las que activan vías intracelulares que asumen la integración y transducción de las señales en el endotelio y el MLV, la noradrenalina, a través de la unión a sus adrenoreceptores va generando repuestos celulares en las que participan proteínas como la PKC, PLC y la AC que activan a segundos mensajeros. De esta manera se lleva en parte la modulación del tono vascular, las isoformas de los receptores α adrenérgicos que toman parte son los α_1 y α_2 adrenérgicos los que se encargan de la regulación del tono vascular de mucha relevancia en la hipertensión arterial (2).

1.1.1.2. Tromboxano A₂

El TXA₂ es un metabolito del ácido araquidónico que se genera debido a la acción secuenciada de 3 enzimas: PLA₂, COXs (COX-1 o COX-2) y tromboxano sintasa. El TXA₂ interviene en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, enfermedad coronaria, infarto agudo al miocardio e hipertensión. Al activarse los

receptores TP por TXA2 contribuyen para que se desarrollen enfermedades cardiovasculares mediante los siguientes procesos: vasoconstricción, agregación plaquetaria, inflamación, estrés oxidativo (EO), expresión de moléculas de adhesión, contracción y proliferación vascular, respectivamente (4). El efecto de la reacción de los receptores a TXA2 está limitada por proteínas G mediante los receptores TP (isoformas α y β), los mismos que se manifiestan en plaquetas (TP α), macrófagos, células endoteliales y células del MLV. Las acciones se traducen en la agregación plaquetaria. La interacción ligando receptor TP produce la activación de diferentes cascadas de señalización que van controlando el flujo celular de iones, la disposición del citoesqueleto, la adhesión celular, la motilidad, los factores de transcripción nuclear, proliferación, supervivencia celular y apoptosis. Hay reportes respecto a que son activados diversos efectores y segundos mensajeros como abajo: IP₃, DAG, AMPc, proteínas G pequeñas (Ras, Rho), fosfoinositol-3 quinasa, así como proteína PKC y PKA. Por otro lado, también el TXA2 al momento de unirse a los receptores TP en el MLV genera una inhibición a canales de K_v, produciendo la despolarización de la membrana celular, activa a canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L, generando un incremento del Ca²⁺ intracelular y favoreciendo la vasoconstricción (2).

1.1.1.3.Serotonina

La 5-HT es un neurotransmisor que tiene la función de mediador químico o neurotransmisor, se encarga de la regulación de funciones nerviosas, gastrointestinales y cardiovasculares. Las actividades fisiológicas de 5-HT están mediadas por 7 subtipos de receptores (5-HT₁-5-HT₇). Los tipos 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B}. El receptor 5HT_{2A}, provoca una vasoconstricción sistémica, mientras que el 5HT_{1B}, genera vasodilatación en las arterias (5).

Los receptores 5-HT_{2A} generan vasoconstricción en las células del MLV. Las contracciones inducidas por 5-HT, que se dan mediante los receptores 5HT_{2A} activan a la PLC mediante la proteína G_q para incrementar los niveles citosólicos de IP que terminan favoreciendo la liberación de Ca²⁺ de los sitios de

almacenamiento intracelular y ocasiona la vasoconstricción. El efecto vasoconstrictor se ve potenciado por el efecto de una diversidad de agentes como la noradrenalina, angiotensina, temperatura o potasio (5).

Las células endoteliales sanas, responden a la 5-HT, incrementando la liberación de NO, con lo cual, se produce la vasodilatación del músculo liso vascular. Al momento que se produce una disfunción endotelial, la 5-HT pierde su capacidad de estimular la liberación de NO y genera un aumento en el tono de los músculos lisos vasculares, provocando vasoconstricción. Además, la 5-HT puede funcionar como un elemento del crecimiento y contribuye a la hipertrofia que se presenta en la capa media, con lo cual, favorece a la reestructuración vascular (5).

Existen reportes de que la 5-HT genera un incremento de la respuesta contráctil en arterias coronarias en pacientes que padecen enfermedad coronaria y aterosclerosis. Adicionalmente, se ha reportado que la 5-HT genera disfunción endotelial en arterias ateroscleróticas mediante la intervención de dos subtipos de receptores, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}, este hecho se ha asociado con un aumento de las concentraciones en plasma de catecolaminas que contribuyen; de esta manera, en la remodelación de las arterias en varias enfermedades vasculares, que incluyen la hipertensión y aterosclerosis. En el caso de los pacientes hipertensos y modelos animales, existen reportes de un aumento en la respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores en células del MLV. Los agentes vasoconstrictores reportados son ET-1, la 5-HT y la noradrenalina, han mostrado asociación con la regulación al alza de sus respectivos receptores, ETA, ETB, 5-HT_{2A} y receptores α adrenérgicos, respectivamente (5).

1.2. Actividad del músculo liso vascular

Existen variados estímulos endógenos que pueden modificar el estado contráctil de las células de MLV que actúan en las estructuras de las células que están presentes en la regulación de la concentración del Ca²⁺ intracelular. La forma de controlar la contracción de las células del músculo liso, está sujeta al potencial de la membrana

celular (E_m) y de la actividad de neurotransmisores autonómicos, y la acción de las sustancias endócrinas y paracrinas sobre receptores específicos.

Considerando algunas excepciones (por ejemplo, la vena porta), el MLV tiene la característica de que carece de actividad eléctrica espontánea. Usualmente, tienen un potencial de membrana en estado de reposo que oscila entre -40 y -60 mV. Dicho valor se mantiene mediante flujos iónicos, a través de canales iónicos de la membrana plasmática en función del gradiente electroquímico y de la permeabilidad que la membrana tiene para cada ion. Está comprobada la participación de distintos tipos de canales selectivos al K^+ y el Cl^- en la regulación y mantenimiento del E_m en el MLV. Posteriormente se menciona como diversos estímulos tienen la capacidad de modificar el valor del potencial de la membrana por modificar la permeabilidad de la misma a los distintos iones. Estos cambios se observan como corrimientos del E_m hacia valores más positivos (despolarización) o hacia valores más negativos (hiperpolarizaciones). Existe una vinculación directa entre el valor del E_m y el estado contráctil del MLV, debido a que el mismo regula la activación de los CCVO, y consecuentemente el influjo de Ca^{2+} hacia el interior de las células. Se toma el siguiente ejemplo, la activación de canales de K^+ produce hiperpolarización de la membrana celular (y relajación vascular) al tiempo que su inhibición va despolarizando la misma, lo cual desencadena la contracción vascular. Las sustancias que son capaces de modular directa o indirectamente el grado de contracción del MLV se denominan sustancias vasoactivas. Además de las que tienen la capacidad de modificar el E_m del MLV mediante la modificación de la permeabilidad iónica; existen sustancias vasoactivas que pueden modular la contractilidad muscular actuando sobre sus propios receptores específicos. Se conoce una gran diversidad de mediadores con la capacidad de modular al MLV (angiotensina II, adrenalina, noradrenalina, histamina, dopamina, ATP, prostaciclina, tromboxano, etc.); no obstante, la gran mayoría lo realiza mediante la activación de receptores acoplados a proteína G. Especialmente, sustancias que tienen presencia de actividad vasoconstrictora (como angiotensina II, noradrenalina, tromboxano, por citar algunas) ejercen influencia sobre sus receptores específicos que se encuentran acoplados a la

proteína Gq que generan la contracción al momento que se produce la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la acción de síntesis de los segundos mensajeros IP3 (que incentiva la liberación de Ca²⁺ del retículo) y DAG/ PKC (que fosforila y activa a los canales de Ca²⁺ tipo L, generando un aumento en el influjo por estos canales). Por su lado, gran parte de las actividades vasorrelajantes mediadas por receptor (por ejemplo: prostaciclina, histamina) son realizadas mediante la activación de receptores que se encuentran acoplados a proteína Gs, que debido a un crecimiento en los niveles de AMPc produce la inactivación de la MLCK por fosforilación de la misma por la PKA. Esta kinasa, por otro lado, puede generar la hiperpolarización del músculo liso por la activación de canales de K⁺, lo que ocasiona un menor influjo de Ca²⁺ (6,7).

En la tabla siguiente se presentan los principales receptores que median la contracción y relajación del MLV:

Tabla N° 1:

Sustancias endógenas vasoactivas y sus receptores presentes en las células de músculo liso vascular

Efecto	Tipo de receptor	Sustancia	Denominación del receptor
Vasoconstricción	Acoplado a proteína Gq	Adrenalina/noradrenalina	α_1
		Angiotensina II	AT ₁
		Serotonina (5-HT)	5-HT ₂
		Acetilcolina ¹	M ₃
		Endotelina	ET _A y ET _B
	Tromboxano (TXA ₂)	TP	
	Receptor ionotrópico: canal catiónico no selectivo	ATP	P2X
	Activación de canales de Ca ²⁺ tipo L vía ROC.	Adrenalina/noradrenalina	α_2
Vasorrelajación	Acoplado a proteína Gs	Adrenalina	B ₂
		Histamina ²	H ₂
		Prostaciclina (PGI ₂)	IP

1 En presencia del endotelio intacto el efecto neto de la Acetilcolina es relajación

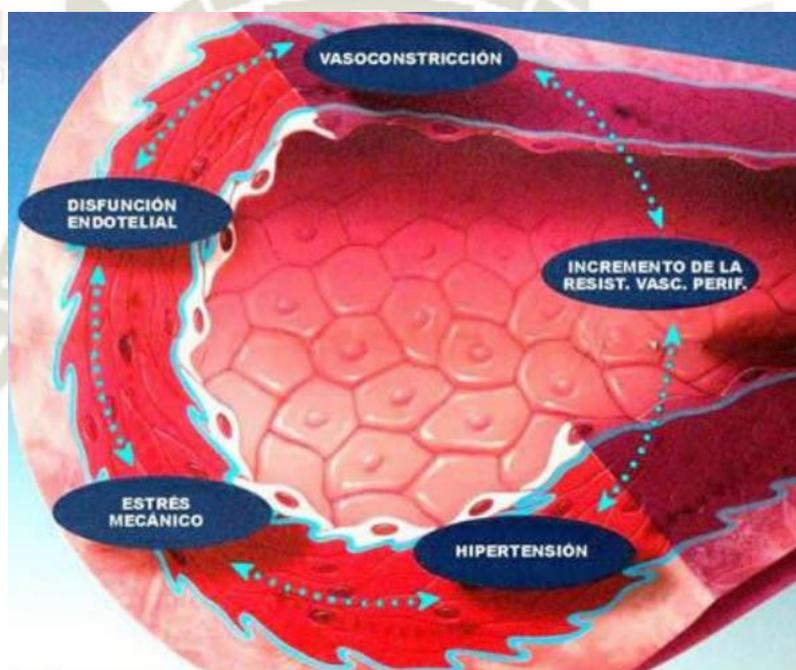
2 La histamina también genera vasodilatación por su actividad a nivel endotelial

Nota. Tomado de Brosovich et al. (6)

1.3. Función endotelial

El endotelio ha sido reconocido como el órgano más extenso del cuerpo humano y, definitivamente uno de los más importantes del cuerpo. Desde su estudio microscópico, se identificó su capa unicelular que sólo dividía dos compartimentos: humoral y tisular. (Figura 1)

Figura N° 1
Función endotelial



El endotelio, en su totalidad, tiene mayor peso que el hígado, su masa equivale a varios corazones, y al desplegarlo, puede cubrir numerosas canchas de tenis, pero lo más destacable es su capacidad para producir más de 60 moléculas, las mismas que cumplen funciones primordiales en la hemostasia y homeostasis vascular.

La regulación del tono vascular, se lleva a cabo mediante la producción de gran número de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Se tiene como una de las primeras, el óxido nítrico (ON), cuya molécula antiaterogénica es la más importante

que se sintetiza en el endotelio, con propiedades que regulan la vasodilatación y con efectos antiproliferativos, antiinflamatorios y antitrombóticos.

La contracción de las células del músculo liso vascular se desarrolla mediante tres mecanismos que producen modificaciones en la homeostasis del calcio al interior de las células:

- Canales de calcio que se activan por despolarización de membrana, los cuales se abren al momento que se produce un cambio de voltaje que permite al calcio extracelular moverse hacia la parte interna de la célula siguiendo su gradiente electroquímico, lo cual produce la contracción (7).
- Contracciones que se inducen mediante agonistas que no despolarizan la membrana, activando receptores acoplados a proteína G, que modulan respuestas intracelulares que terminan produciendo un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma, lo cual produce la contracción (8).
- Canales de calcio que son operados por receptores que se activan por neurotransmisores y hormonas (7).

En general, el control de la musculatura lisa vascular se da mediante un control local (intrínseco) que se determina mediante mecanismos de autorregulación, metabólicos, hiperemia activa e hiperemia reactiva, además de un control central (extrínseco) que incluye mecanismos humorales y neuronales (9).

Dentro del mecanismo humoral, se destacan las hormonas que tienen acción vasoactiva como angiotensina II, vasopresina, prostaglandinas, bradicinina, serotonina, histamina, prostaciclina, y catecolaminas circulantes, estas últimas mencionadas son las que se liberan por estimulación simpática (10). El control neuronal se realiza mediante el sistema nervioso autónomo (S.N.A). Dado que este sistema es involuntario y controla las funciones viscerales del organismo, es activado principalmente por centros ubicados en la médula espinal, tallo cerebral, hipotálamo

y porciones de la corteza cerebral (corteza límbica) que tienen influencia en el control autónomo (11).

Por lo tanto, se encarga de la contracción y relajación de la musculatura lisa vascular (10).

1.3.1. Receptores

El sistema nervioso autónomo se divide en sistema nervioso simpático y parasimpático, que tienen bases anatómicas y funcionales diferentes. El sistema nervioso autónomo inerva la gran mayoría de los órganos, cuya respuesta es usualmente opuesta, mientras los nervios simpáticos incrementan la contractibilidad vascular, los nervios parasimpáticos producen su relajación, esta actividad nerviosa es captada mediante receptores (11).

Se denomina receptor a cualquier macromolécula celular, usualmente una proteína celular, mediante la cual se vincula un fármaco o un neurotransmisor para dar inicio a la consecuente propagación de su señal reguladora en la célula señalada como *blanco* (7). Es importante tener en cuenta que los neurotransmisores son agentes químicos específicos. A través de ellos, los nervios realizan la transmisión de información durante la mayor parte de las sinapsis y las uniones neuroefectoras (7).

Todas las fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas se caracterizan por tener como neurotransmisor específico a la acetilcolina, que realiza la transmisión por interacción con los receptores colinérgicos nicotínicos. Las fibras posganglionares parasimpáticas y varias simpáticas son también de carácter colinérgico, que actúan sobre receptores muscarínicos. Un gran número de las fibras posganglionares simpáticas liberan noradrenalina, por lo que son denominadas como adrenérgicas (12).

La acetilcolina que se encuentra en las fibras simpáticas preganglionares, estimula la médula suprarrenal para que se produzca la secreción de catecolaminas

naturales (noradrenalina, adrenalina y dopamina), que son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Las catecolaminas se encargan de estimular dos clases de receptores adrenérgicos conocidos como alfa y beta. La noradrenalina estimula básicamente a los receptores alfa y en menor proporción a los beta. La adrenalina actúa sobre ambos tipos de receptores en la misma proporción (11).

Los estudios realizados sobre la fijación de radioligandos agonistas o antagonistas demuestran que dentro de un mismo órgano coexisten varios subtipos de α y β receptores, en diferentes proporciones, tal como sucede en la pared vascular. Los α -receptores son estimulados, ordenadamente de mayor a menor potencia, por adrenalina, noradrenalina e isoproterenol y son asociados a una actividad contráctil de la musculatura lisa vascular. Teniendo en consideración los factores funcionales y anatómicos, se clasifican en dos grandes grupos: los receptores presinápticos que se clasifican como α_2 -adrenérgicos, cuando se activa, inhiben la liberación de noradrenalina, generando un efecto de retroalimentación negativa, y los receptores postsinápticos *excitatorios* que se clasifican como α_1 (12). Los receptores β -adrenérgicos, se estimulan mediante agonistas adrenérgicos ordenados de mayor a menor potencia por isoproterenol, adrenalina y noradrenalina, y son asociados a una actividad relajadora de la musculatura vascular. Son divididos en 8 β_1 , que son predominantes en el miocardio, β_2 ubicado principalmente en el músculo liso y β_3 con presencia en el tejido adiposo (12,6).

La acetilcolina es el neurotransmisor de las fibras parasimpáticas posganglionares, que es sintetizada en la terminal axonal y se deposita en vesículas sinápticas. Esta síntesis se realiza por unión del grupo acetilo del acetyl coenzima A con la colina. La acetilcolina genera la activación de dos tipos diferentes de receptores llamados receptores muscarínicos y nicotínicos. Los receptores nicotínicos se hallan en la sinapsis que se realiza entre las neuronas pre y posganglionares de los sistemas simpático y parasimpático, así como en las membranas de las fibras musculares esqueléticas en la unión neuromuscular. Los receptores muscarínicos están

presentes en todas las células efectoras que son estimuladas por las neuronas posganglionares del sistema nervioso parasimpático (11).

Los receptores muscarínicos están dentro de la súper familia de las proteínas receptoras, cuyo funcionamiento está mediado por la interacción con proteínas G. Se desconocía de la diversidad de los receptores muscarínicos hasta que, a fines del decenio de 1970, se hizo un análisis de la farmacología de la Pirenzepina. Las observaciones realizadas, y el estudio que se realizó seguidamente de otros agonistas y antagonistas, a los que siguieron rápidos adelantos en la clonación de diversos DNA que codifican los receptores muscarínicos, han logrado la identificación de cinco subtipos de estos receptores. Se han designado M1 a M5 basados en su especificidad farmacológica (7).

Los receptores M1 se encuentran presentes en ganglios autonómicos y en la corteza cerebral; los receptores M2, tienen predominancia en el miocardio y en mucho menor grado se encuentran en la musculatura lisa; los receptores M3 y M5, se hallan en las células secretoras, en las células de musculatura lisa y en las células endoteliales; los receptores M4 se encuentran ubicados en las células endoteliales y en las neuronas ganglionares (12).

Las interacciones que se llevan a cabo con los miembros de la familia de proteínas G y, por tanto, aquellos cambios que son, generalmente, inducidos por estas proteínas e intervienen en las funciones de las diversas moléculas efectoras que están ligadas a la membrana, e intervienen como mediadoras de las funciones básicas de los receptores muscarínicos. Los subtipos M1, M3 y M5 activan a la proteína G denominada Gq/11, que está a cargo de la estimulación de la actividad de fosfolipasa C; como resultado inmediato se genera la hidrólisis de polifosfatos de fosfatidilinositol (los mismos que son componentes de la membrana plasmática) para que se puedan formar los polifosfatos de inositol. Algunos de los 9 isómeros de fosfato de inositol (principalmente inositol-1,4,5-trisfosfato) generan descarga de Ca^{2+} intracelular desde los lugares donde se almacenan, en el retículo endoplásmico. Por lo tanto, estos receptores median los fenómenos

dependientes del Ca^{2+} mencionados, como contracción del músculo liso y secreción. El segundo producto generado por la reacción de fosfolipasa C, el diacilglicerol, produce la activación de la proteincinasa C (en conjunto con el Ca^{2+}) (7).

Un segundo camino para la aparición de las reacciones de los agonistas muscarínicos es aquella que es evocada al momento de la activación de los receptores M2 y M4. Dichos receptores tienen interacción con un grupo determinado de proteínas G (particularmente en las denominadas G1 y G0) que muestran una inhibición resultante de la adenilciclase, y mediante la activación de los canales del K^{+} que son operados por receptores (como en el corazón) y la supresión de la actividad de los canales del Ca^{2+} con compuerta de voltaje que se presenta en algunos tipos de células. Las consecuencias funcionales de los efectos referidos, se pueden apreciar más claramente en el miocardio. Los receptores muscarínicos que se encargan de la relajación vascular, se encuentran ubicados en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los mismos, que al momento de ser estimulados, descargan factores de relajación que son difundidos hacia las células del músculo liso adyacente (13).

Se puede decir que, en términos generales, los receptores muscarínicos colinérgicos del tipo M3 se hallan en las células del endotelio, así como en las células del músculo liso de un buen número de arterias y arteriolas. Al momento de activarse estos receptores en las células del músculo liso, se provoca una contracción. Sin embargo, este efecto vasoconstrictor termina usualmente anulado por el efecto vasodilatador de activar los receptores M3 en las células del endotelio vascular. En esta organización poco peculiar, la activación de los receptores M3 de las células endoteliales provoca la síntesis de óxido nítrico, que, posteriormente, es difundido fuera de las células endoteliales y dentro de las células del músculo liso cercano en el cual actúa como un vasodilatador. El efecto vasodilatador estimulante que se produce en los receptores M3 de la célula endotelial es más poderoso que el efecto vasoconstrictor estimulante producido y

de los receptores M3 del músculo liso. Por tal motivo, el papel de los receptores M3 del músculo liso siguen siendo un misterio (9).

Es necesaria la presencia del endotelio para que la acetilcolina genere la relajación *in vitro* de un anillo de aorta de conejo (9). Puesto que dicha relajación no se podía atribuir a prostaciclina, a consecuencia de que el experimento se realizó con la presencia de inhibidores de 10 ciclooxigenasa. Se llegó a la conclusión de que fue la relajación endotelio dependiente producida por acetilcolina como resultado de la liberación de una sustancia liberada por el endotelio que fue denominada como Factor relajante derivado de endotelio (EDRF). Identificaron el EDRF como óxido nítrico, el cual es sintetizado a partir de L-arginina. El óxido nítrico participa como mediador local de los denominados vasodilatadores endotelio dependientes, como la acetilcolina y la bradiquinina, o como mediador de la acción vasodilatadora que se produce en los procesos inflamatorios como respuesta a la histamina o la bradiquinina (13).

Prostaciclina (PGI₂), es otro elemento relajante que se deriva del endotelio, cuyas sus principales acciones son la inhibición de la agregación plaquetaria y la relajación de las células de la musculatura lisa vascular. Se genera su liberación por efecto de la acetilcolina, bradiginina y angiotensina II (10).

El factor hiperpolarizante que se deriva del endotelio (EDHF), es a la vez un factor de relajación que depende del endotelio, éste produce mayormente una relajación del músculo liso vascular dado que induce la hiperpolarización de su membrana celular. Se libera por concentraciones elevadas de acetilcolina y bradiginina, de manera que injiere parcialmente en los efectos vasodilatadores de estos agentes (10). Entre los factores que derivados del endotelio que actúan como constrictores de la pared vascular, se encuentra la endotelina (ET) y los factores constrictores que se derivan del endotelio, denominados genéricamente así por su naturaleza, que hasta el momento no está establecida. Estos serían mediadores de la vasoconstricción que se genera a causa de la hipoxia y el incremento en la presión transmural (10).

Con base en lo expuesto anteriormente, el endotelio vascular se considera como el principal órgano a cargo de la regulación vascular, trabaja en calidad de receptor y transmisor de señales, puesto que tiene la capacidad de registrar cambios hemodinámicos, interactuar con las células de la sangre, modificar los mensajeros químicos circulantes y responder a dichos cambios a través de la liberación de numerosos factores vasoactivos (10). Es por este motivo, que casi todas las molestias cardiovasculares se asocian a una disfunción del endotelio vascular (13). En general, los receptores muscarínicos M3 son mediadores en la relajación endotelio dependiente, mientras que la contracción puede ser mediada mediante diversos subtipos.

La relajación vascular también se puede mediar mediante por mecanismos endotelio independientes, de acuerdo a la ubicación anatómica del vaso. Se ha evidenciado de que los receptores muscarínicos M3 median la relajación de la arteria coronaria en los equinos, la vasculatura renal de los ratones, la aorta de las liebres, las mesentéricas de las ratas, la arteria uterina de los cerdos, las arterias cerebrales de los felinos, las arterias coronarias de los simios y algunas arterias bronquiales aisladas.

En los vasos aislados de pulmón de rata, receptores muscarínicos M1 y M2 median la vasodilatación directa e indirecta respectivamente. Pero, al mismo tiempo, se ha observado que los receptores muscarínicos M3 median la contracción en coronarias de rata y arterias pulmonares en los humanos. Es por tal motivo, que los receptores muscarínicos que median la contracción y relajación tienen diferencias de acuerdo a la especie y ubicación anatómica (14).

1.3.2. El neurotransmisor acetilcolina (ACh)

Se ha denominado con el nombre de fármacos colinérgicos a los fármacos que pretenden imitar la acción de la acetilcolina que se libera en las terminaciones posganglionares parasimpáticas. Acetilcolina es una molécula de tipo flexible, y las pruebas indirectas que se han realizado, sugieren que, respecto a las conformaciones del neurotransmisor, éstas son diferentes cuando se le encuentra

fijado en los receptores nicotínicos o muscarínicos (15). Los receptores muscarínicos han sido definidos como aquellos que se activaban selectivamente por muscarina y se bloquean por atropina y los receptores nicotínicos como los que se activan por nicotina y bloqueados por curare (16). En la actualidad, se tiene conocimiento por los estudios realizados en biología molecular, de la existencia de múltiples variantes de ambos tipos de receptores, los cuales son integrantes de dos familias de genes distintos y que tienen la característica de poder activarse por el mismo ligando, la acetilcolina (16).

Respecto a los fármacos que actúan sobre los receptores muscarínicos, se identifica un grupo denominado agonista colinérgico de acción muscarínica, dentro del cual se halla acetilcolina, metacolina, carbacol, betanecol, muscarina, pilocarpina y oxotremorina que es de origen sintético (10). Estos fármacos agonistas tienen una característica, que es su capacidad de ligar a receptores fisiológicos o imitar los efectos que ocasionan los compuestos reguladores endógenos, teniendo interacción de forma reversible con su receptor, por lo cual el efecto es proporcional con el número de receptores ocupados y se percibe un efecto máximo al momento que todos ellos están ocupados (7).

Los agonistas muscarínicos tradicionales, poseen una selectividad que es limitada por un determinado órgano o sistema. El efecto que produce sobre el sistema vascular está dado por la vasodilatación que se generaliza a nivel de las arterias y contracción a nivel venoso que depende del adecuado estado del endotelio, esto aplica para la acetilcolina que es un agente vaso relajador endotelio-dependiente, tal como todos los agonistas muscarínicos mencionados, adicionalmente es el neurotransmisor endógeno colinérgico que pertenece al sistema nervioso central y periférico (12,7).

Los fármacos que tienen efecto a nivel de órgano y bloquean el efecto de la muscarínica de acetilcolina, es decir que generan una inhibición de la función del sistema parasimpático, son llamados anticolinérgicos, antimuscarínicos o antagonistas colinérgicos (17). Los fármacos antagonistas tienen la peculiaridad

de unirse al receptor para lograr la inhibición de la actividad de un agonista, pero no desencadenan efecto alguno por sí mismos. El antagonismo competitivo se desarrolla cuando se vence el efecto inhibitorio o se supera mediante el aumento de la concentración del agonista, finalmente se alcanzará su máximo efecto. Mientras tanto el antagonismo no competitivo se ocasiona cuando el fármaco antagonista tiene actividad en un lugar de fijación relacionado íntimamente con el receptor, pero distinto al sitio de fijación del agonista, evitando que el receptor en cualquiera sea su concentración, tenga la capacidad de producir su efecto máximo (12,7).

Se conoce la existencia de dos fármacos anticolinérgicos de renombre que son alcaloides naturales (se extraen de plantas), el más importante, por su uso clínico es la atropina, que es extraída de las plantas denominadas *Atropa belladonna* y *Datura stramonium*. El otro renombrado alcaloide es conocido como escopolamina que es obtenida de la *Hyoscyamus niger*. A partir de estos alcaloides se derivan otros de tipo sintético, tales como: homatropina, bromuro de metescopolamina, metilbromuro de escopolamina, metilbromuro de homatropina, anisotropina, climidio, glicopirrolato, ipratropio y fentonio (17).

Los anticolinérgicos han mostrado tener diversas aplicaciones terapéuticas, como por ejemplo, el bloqueo de la hiperactividad parasimpática, en condiciones de presencia de hiperactividad gastrointestinal y urinaria, cuando se presenta úlcera gastroduodenal, en enfermedad respiratoria, medicación preanestésica, aplicaciones oftálmicas, depresión del sistema cardiovascular (17).

1.3.3. Factores endoteliales

En 1980 Furchgott y Zawadski (18) indicaron que el endotelio es un regulador de la vasodilatación, demostraron que los anillos arteriales pre contraídos podían relajarse como respuesta a la acetilcolina, solo en caso las células del endotelio se encontraban intactas, lo cual implica que la respuesta estaba mediada por alguna sustancia que se deriva del endotelio, Furchgott propuso, en 1986, de que esa sustancia era el NO.

1.3.4. Disfunción endotelial

Hay momentos en los que el endotelio reduce su capacidad vasodilatadora y aumenta su acción vasoconstrictora (disfunción endotelial), lo cual lo convierte en un epitelio lesionado disfuncionante. Separa a los mediadores “erróneos”, perdiendo su capacidad para mantener su dilatación, a causa de ello, predominan las sustancias vasoconstrictoras (endotelina, Angiotensina II) sobre las vasodilatadoras (NO, prostaciclina), liberando la segregación de radicales libres que ejercen un efecto oxidante en diversos compuestos como, por ejemplo, el transportador de colesterol de baja densidad (LDL).

A este estado se le denomina como disfunción endotelial, puede ser cuantificado experimentalmente mediante la observación de la respuesta de los vasos sanguíneos a la acetilcolina que, en disfunción, no dan respuesta con un incremento del diámetro vascular o con el incremento respectivo del flujo sanguíneo sino, que la respuesta se desvanece o, caso contrario, en situaciones de gravedad responde con vasoconstricción que se conoce como el efecto paradójico de la acetilcolina.

El endotelio que muestra disfunción por hipertensión, hiperlipidemia, tabaquismo o diabetes, evidencia un efecto vasoconstrictor paradójico a la acetilcolina. El endotelio disfuncionante se transforma en el eje fundamental de muchas patologías cardiovasculares. De tal forma que se encuentra involucrado dentro del proceso de aterosclerosis, de la hipertensión arterial, de la disfunción microcirculatoria, vasoespasmo, del síndrome isquemia-reperfusión y del aturdimiento miocárdico, proliferación del músculo liso e hiperplasia de la íntima. También se le reconoce como cómplice del proceso de inflamación, coagulopatías, sepsis y diabetes (19).

1.3.5. Niveles de alteración endotelial

- La activación endotelial, es un fenómeno inicial que ejercita el endotelio todos los días, con el objetivo de mantener la homeostasis de las diversas funciones que regula (20).
- La disfunción endotelial leve, es aquella por la cual los diversos factores de riesgo modifican la regulación del endotelio y empieza a imponerse la producción de moléculas de adhesión y proinflamatorias, asociada a la elevación de las citocinas. Este estadio es potencialmente reversible con el uso de fármacos que protejan el endotelio (20).
- Finalmente, en la fase de disfunción endotelial avanzada, se muestra profundas alteraciones anatómicas y funcionales, favoreciendo los mecanismos inflamatorios y protrombóticos. Además por tratarse de una etapa más avanzada, la respuesta terapéutica pierde efectividad (20).

1.3.6. Hipercolesterolemia y arterosclerosis

El colesterol, siendo un componente esencial de las membranas celulares, y elemento de las lipoproteínas, es también precursor de muchas hormonas y sales biliares. Cuando se abusa del colesterol alimentario se produce la hipercolesterolemia. Así, por cada 100 mg de colesterol que se introduce al organismo (1000 calorías) se genera un incremento del colesterol de aproximadamente 8-10mg/dl. Las lipoproteínas movilizan al colesterol y los receptores que se hallan en las membranas de las células ingresándolo dentro de ellas. El número de receptores varía de acuerdo a la necesidad diaria de colesterol de 5.000 a 50.000. Las grasas saturadas obstruyen a los receptores e incrementan el grado de colesterol en la sangre. Las moléculas denominadas apoproteínas cumplen la función de unir las lipoproteínas a los receptores. Cuando la apoproteína se oxida por la acción de los radicales libres, el receptor no puede reconocerla y en ese instante comienza la génesis de la arteriosclerosis.

La arterosclerosis, cuyo significado literal es *endurecimiento de las arterias*, por otra parte, se refiere al grupo de trastornos que producen el engrosamiento y la pérdida de la propiedad elástica de las paredes arteriales. Los radicales libres que se encuentran dispersos por el endotelio disfuncionante son los que oxidan al transportador de colesterol (LDL), que ingresa a la célula endotelial. La lipoproteína de baja densidad, atrae monocitos de la sangre circulante que harán el intento de fagocitarla, los cuales al convertirse en macrófagos atraen células musculares lisas que se trasladan de la capa muscular hacia la íntima (células espumosas) en la que serán participes en el proceso de fibrosis. La alteración funcional, así como la inflamación crónica que persiste en la pared arterial, dando origen a la formación de la placa ateromatosa.

Se inicia una verdadera lluvia de fuego cruzado entre moléculas biológicamente activas, ocasionada por la presencia de la LDL oxidada, así como la disfunción endotelial en la cual todas las células ubicadas en la luz y en la pared del vaso se convierten en origen y diana; al mismo tiempo que una gran cantidad de sustancias generan la producción de secreciones en cadena que provocan la aproximación entre las células, contacto, adhesión y proliferación. Es resumen, se trata de un proceso inflamatorio crónico que genera en la pared arterial la aparición y el desarrollo de la placa de ateroma, que es un elemento de base de la arterosclerosis (21).

La placa lipídica que se desarrolla en la pared arterial condiciona que el endotelio disminuya la producción de óxido nítrico, entre otros, y, a consecuencia de ello, se produce la pérdida de su actividad vasodilatadora. Adicionalmente, se observa que, a medida que progresa la arterosclerosis se desarrolla una renovada “capa íntima”, la misma que se convierte en una barrera que interfiere la difusión de los factores relajantes derivados del endotelio. Por tal motivo, las células de los músculos lisos vasculares van perdiendo la propiedad de respuesta al óxido nítrico. El aumento de la LDL genera una baja en la producción y neutralización del EDRF y de Prostaglandina I₂, así como el aumento de la producción de

Endotelina-1 y del Tromboxano A2, todo ello confluye en una hegemonía de la vasoconstricción.

A través de estudios se ha podido establecer que se debe determinar el endotelio disfuncional, previo al proceso del aterosclerosis. Por lo que queda claro que el endotelio desempeña un papel relevante en el inicio y las complicaciones de este hecho. Se ha identificado que la peroxidación lipídica dentro de las lipoproteínas que tienen baja densidad (LDL), es el factor desencadenante de la aterogénesis. Las LDL al momento de que se logra la extracción de un electrón de la grasa poliinsaturada, se generan radicales libres, ante la falta de sustancias antioxidantes. Durante todo este proceso, está presente un denominador común, substrato fisiopatológico en todas sus etapas, es la endotelitis, que se produce desde las etapas iniciales hasta las avanzadas, estableciendo un puente con la trombosis, un factor que hace evolucionar raudamente a la aterosclerosis y conduce a sus temidas complicaciones, tales como los síndromes coronarios agudos y el stroke (19).

1.3.7. Otros marcadores de disfunción endotelial

1.3.7.1. Estrés oxidativo

Las ERO engloba varias moléculas, que muestran amplios efectos y funciones celulares. En situaciones fisiológicas, se puede apreciar un equilibrio en la regulación de la producción y eliminación de las ERO; en cambio, en condiciones patológicas, se presenta un desequilibrio entre la actividad de las enzimas generadoras de ERO y su degradación, lo cual genera un incremento de la producción de ERO, desencadenando un estado de EO. Respecto al sistema cardiovascular, los efectos de los ERO provocan diferenciación y crecimiento celular, modulación de la producción de la matriz extracelular, inactivación del NO y estimulación de algunas cinasas. En conclusión, ha quedado establecido que las ERO son partícipes en el desarrollo de la hipertensión provocando alteraciones estructurales y funcionales (22).

Se ha observado que los pacientes con hipertensión presentan una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes endógenas a nivel sanguíneo y en células mononucleares, lo cual es un indicador de un incremento de EO en comparación con individuos normotensos. Al momento de medir directamente la producción de ERO en células de mononucleares, se pudo mostrar que las células aisladas a partir de pacientes hipertensos mostraban altos niveles de producción de radicales superóxidos (22).

Por otra parte, diversos modelos de hipertensión muestran un aumento del EO relacionado tanto a un incremento en la producción vascular de O_2^- (23) como a una disminución de la actividad de las defensas antioxidantes vasculares de enzimas más importantes, como la SOD, la GPx, la catalasa y barredores de ERO como vitamina A, C y E (24). No obstante, también se encuentran resultados contrarios, en los que un incremento en la expresión de las SODs y GPx en aorta de ratas hipertensas, que es interpretado como un mecanismo adaptativo para disminuir la elevada producción de radicales. El aumento de la producción de ERO, también, se ha asociado con un incremento en la expresión y actividad de enzimas como la XO, NOS o NAD(P)H oxidasa (25). En diversos modelos animales que presentan hipertensión arterial inducida por Ang II, SHR o DOCA-salt entre otros, se ha observado que la NAD(P)H oxidasa tiene un desempeño relevante en el desarrollo de la HAS. Además, se ha observado en estos modelos animales que presentan hipertensión, un aumento en los marcadores de estrés oxidativo como malondialdehído (MDA) e isoprostanos. El incremento del EO contribuye a la disfunción endotelial y el aumento de la respuesta contráctil, el EO reduce la biodisponibilidad del NO y genera ONOO- (26).

La disfunción endotelial se considera como un pronosticador temprano de los eventos cardiovasculares, especialmente en pacientes hipertensos, la disfunción endotelial muestra una reducción en la biodisponibilidad de NO y a un incremento del EO. El endotelio, en condiciones patológicas, muestra modificaciones en su fenotipo mediante procesos de vasoconstricción, inflamación y eventos trombóticos. Esta respuesta anormal se manifiesta en diversos estados clínicos,

dentro de los cuales se puede mencionar hipercolesterolemia, diabetes mellitus e hipertensión, éstos se desarrollan en ausencia de cambios morfológicos en la pared vascular. La etiología de estas alteraciones de la función endotelial involucra múltiples factores, y los principales mecanismos no se encuentran totalmente dilucidados. En la actualidad, existen evidencias relevantes respecto al gran número de funciones endoteliales que son susceptibles a la presencia de ERO y el subsiguiente al EO. Mediante estudios, se ha establecido que el EO puede ser el culpable del aumento del tono vascular, así como del aumento de la sensibilidad a agentes vasoconstrictores; de igual manera influye en la disminución de la respuesta vasodilatadora que depende del endotelio. En presencia de EO, el anión superóxido se ha convertido en el más estudiado, éste trabaja neutralizando al NO, al momento de la interacción con el NO se forma el peroxinitrito, favoreciendo el efecto vasoconstrictor, por lo cual se concluye que la disminución de la biodisponibilidad del NO incrementa el riesgo de que se produzca una disfunción endotelial, genera un incremento en la adhesión y agregación plaquetaria, la quimiotaxis de monocitos y la proliferación de las CMLV; por lo cual, finalmente favorece la aparición de la HTA, hipertrofia vascular y enfermedad vascular oclusiva.

La disfunción endotelial tiene la característica de mostrar un cambio fenotípico y un incremento en la adhesividad de las células vasculares, que se realiza a través de la liberación de moléculas de adhesión como el factor de von Willebrand (vWF), intercelular-1 (ICAM-1), las moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y las E-selectinas. Entre estos, el vWF ha sido el más extensamente estudiado de estos productos endoteliales, a nivel plasmático las moléculas de adhesión solubles (E-selectinas, ICAM-1, VCAM-1) también mostraron altos niveles en pacientes hipertensos.

El incremento del EO es ocasionado por una disfunción producida en el sistema de transporte mitocondrial de los electrones, la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, la activación de neutrófilos, el metabolismo del ácido araquidónico y la autooxidación de catecolaminas. Estas especies químicas tienen gran importancia

biológica dado que pueden producir una alteración de la estructura de las membranas celulares, produciendo daño en las proteínas intracelulares, provocando la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y generando la aceleración del envejecimiento celular (27).

La ERO más común es el anión superóxido, que se genera en células vivas por la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, el citocromo P450 microsomal y las enzimas mitocondriales que integran la cadena encargada del transporte de electrones. La autoxidación de la hemoglobina da como resultado la generación de O_2^- , también es generado mediante las reacciones de algunas moléculas con el oxígeno (adrenalina, dopamina, tetrahidrofolato, citocromos y por células en que se suscita el mecanismo de la fagocitosis como los polimorfonucleares neutrófilos, monocitos, macrófagos), así como los iones metálicos que son parte de los elementos de transición, particularmente cuando se les encuentra en el estado reducido, son propensos de sufrir una autoxidación a la vez que transforman la molécula de oxígeno en O_2^- .

El H_2O_2 , a pesar de no ser un radical libre, es considerado una de las especies reactivas de oxígeno que posee la capacidad de generar un radical libre reactivo en extremo, como es al hidroxilo (OH) en presencia de iones metálicos como Fe^{2+} Cu^+ ó Mn^+ mediante la reacción de Fenton. Estos iones, al estado reducido, también tiene la propiedad de catalizar la reacción entre el H_2O_2 y el anión superóxido, comúnmente conocida como la reacción de HaberWeiss (27). Es importante tener en cuenta que los iones metálicos que poseen los elementos de transición tienen la capacidad de catalizar estas reacciones químicas solo en el momento en que se encuentran libres. Por tal motivo, una manera de controlar este efecto es mediante la formación de complejos con sustancias quelantes, por cuyo intermedio se previene la formación de radicales libres.

El endotelio es un tejido que posee alta sensibilidad al daño que producen los radicales libres, afectando a lípidos, proteínas y ADN. El daño se puede inducir tanto por las ERO o de nitrógeno, como el peroxinitrito. La hipertensión presenta

asociación con una elevación de las ERO y frecuentemente también con un deterioro de los mecanismos antioxidantes endógenos (28). En ratas que presentan hipertensión espontánea, se ha reportado un incremento de ERO en la pared vascular, corazón y riñón, tales como H₂O₂, O₂⁻, y marcadores de oxidación tales como F₂-isoprostanos, malondialdehído (MDA), así como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (28).

1.4.Presión arterial

1.4.1. Factores que determinan la presión arterial

La presión arterial (PA) se determina en base a dos factores: el gasto cardíaco y la resistencia periférica total. La modificación producida en estos dos factores genera cambios relevantes en el nivel de la PA. La regulación de la PA se determina por la acción del sistema nervioso autónomo y los centros que regulan la actividad cardiovascular del sistema nervioso central, los factores vasodilatadores y vasoconstrictores, así como el riñón. Cada uno de estos sistemas tiene diferentes reacciones de acuerdo a la forma y tiempo (29).

1.4.2. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial sistémica (HTA) es una patología ocasionada por múltiples factores, se caracteriza por el aumento constante de la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD) o ambas, en ausencia de enfermedad cardiovascular renal o diabetes >140/90 mmHg [NOM-030-SSA2-2009]. De acuerdo al Séptimo Informe del Joint National Comité sobre prevención, detección, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial ha presentado una calificación de los valores de la presión arterial en adultos mayores de 18 años, a quienes no se administre medicación antihipertensiva y que no padezcan de enfermedades agudas simultáneas a la toma de presión arterial (30).

Tabla N° 2:
Valores de presión arterial sistémica. Valores que corresponden a la presión arterial sistólica (PAS) / presión arterial diastólica (PAD) para adultos mayores

Categoría	PAS	PAD
Normal	<120 mmHg	<80 mmHg
Elevada	<120-129 mmHg	<80 mmHg
HIPERTENSIÓN		
Estado 1	130-139 mmHg	80-89 mmHg
Estado 2	≥140 mmHg	≥120 mmHg

Nota. Tomado de Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009 (30).

1.4.3. Epidemiología

Factores que permiten la medición de las cifras de presión arterial, el incremento de la presión arterial en relación con la edad y la prevalencia de hipertensión, muestran variaciones de un país a otro y entre subpoblaciones que viven en un mismo país. La hipertensión se encuentra presente en todas las poblaciones, a excepción de un pequeño número de sujetos que habitan en sociedades primitivas que conservan un aislamiento cultural. En las sociedades más industrializadas, la presión arterial muestra un incremento en forma lenta y sostenida durante los primeros dos decenios de la vida. Respecto a los niños y adolescentes, se ha observado que acompaña al crecimiento y la maduración. La presión arterial va aumentando gradualmente con el transcurso del tiempo en niños, adolescentes y adultos jóvenes. En la población de Estados Unidos, se ha visibilizado que la presión arterial sistólica promedio es mayor en los varones que en las mujeres en los inicios de la edad adulta, se observa también que, en los sujetos de mayor edad, el progreso del incremento de la presión arterial en relación con el envejecimiento es más marcado en mujeres. Consecuentemente, en personas de 60 años y de mayores edades, las presiones sistólicas tienen mayores índices en mujeres que en varones. La población en edad adulta, también presenta un incremento en la presión diastólica en forma progresiva hasta que la edad promedio de 55 años,

fecha posterior a la cual, tiene tendencia a disminuir. A consecuencia de ello, se muestra la presencia de un ensanchamiento de la presión diferencial o del pulso (diferencia entre la presión arterial sistólica y diastólica) pasados los 60 años. La estadística muestra de que la probabilidad de que una persona con edad avanzada, pueda desarrollar hipertensión durante toda su existencia es de 90% (2).

Los factores ambientales y los genéticos tienen influencia en las variaciones que se muestran a nivel regional y racial en la presión arterial y la incidencia de la hipertensión. Los datos mediante estudios realizados en sociedades sometidas a aculturación y de personas que migran de un entorno menos urbanizado a otro más urbanizado, muestran evidencia de que el entorno contribuye profundamente en la presión arterial. La obesidad y el sobrepeso, son factores que influyen poderosamente sobre el riesgo de sufrir hipertensión. Los cálculos muestran que 60% de los hipertensos tienen sobrepeso. Existe entre la población, la prevalencia de que la hipertensión se encuentra vinculada con la ingestión de cloruro de sodio en los alimentos, que cuando se consume en exceso, puede elevar significativamente el incremento de la presión arterial con el paso del tiempo y por el envejecimiento. El consumo de muy pocas cantidades de calcio y potasio en los alimentos, contribuye de la misma manera al riesgo de que se acentúe la hipertensión. La proporción sodio/potasio en la orina constituye un factor de correlación de mayor peso en la presión arterial, que cuando ambos participan individualmente. Otros factores que contribuyen a la hipertensión son el consumo de alcohol, el estrés psicosocial en el que se vive y los bajos niveles del ejercicio físico (2).

La adopción, la condición gemelar y estudios familiares corroboran que, respecto a los datos sobre la incidencia de la presión arterial y la hipertensión existe un notorio componente hereditario. Estudios en familias en las que se hizo control del entorno común, mostraron que las posibilidades de heredar la presión arterial están en límites de 15 a 35%. En estudios de hermanos gemelos, la posibilidad de heredar la presión arterial es cercana a 60% en varones y 30 a 40% en mujeres. El incremento en los índices de la presión arterial antes de los 55 años se muestra que

hay una frecuencia 3.8 veces mayor en personas con un antecedente familiar positivo de hipertensión (2).

1.4.4. Fisiopatología de la hipertensión

1.4.4.1. Alteraciones vasculares: endotelio y musculo liso vascular

Las propiedades mecánicas que muestra la pared arterial son de importancia en la regulación de la presión arterial, al examinarlas, se contribuye en la ampliación del conocimiento de la enfermedad hipertensiva (2). Las arterias con propiedades elásticas o de conducción se encuentran adaptadas para cumplir la función de amortiguadores de las variaciones de presión, lo cual reduce el flujo pulsátil del corazón y permite un flujo sanguíneo constante. Al momento que se produce la sístole, la sangre se impulsa por el ventrículo izquierdo directo hacia la arteria aorta, de manera que se proyecta contra la pared arterial con una gran fuerza. Se ha determinado que, si el tejido de la aorta no fuera flexible, la sangre que es expulsada del corazón alcanzaría una velocidad enorme, no sólo en la aorta, sino también en partes más distales del árbol vascular, lo cual provocaría que la sangre viaje a gran velocidad, generando un desgaste en las paredes arteriales y, adicionalmente, generando un daño a los elementos formes de la sangre. Sin embargo, el tejido de la aorta y el de otras grandes arterias poseen una gran capacidad elástica gracias a que presentan las laminillas elásticas que conforman parte de la pared, estas fibras elásticas toman parte en la regulación de la PA, puesto que almacenan temporalmente la energía que se produce por la contracción del corazón al momento de la sístole. Al momento de la diástole, la liberación de esta energía logra que la aorta pueda regresar a su tamaño original propulsando la sangre contenida. De tal forma, que estas variaciones de presión que se produce en las arterias durante el ciclo cardiaco presentan una amplitud relativamente pequeña y distalmente resultan en un flujo continuo (8). Este flujo continuo puede verse afectado si se producen alteraciones en la elasticidad de los vasos de conducción. Además, una pérdida de las propiedades elásticas en la aorta, pueden producir un incremento de la presión de salida, lo cual contribuye al desarrollo de

hipertensión arterial. Estas pérdidas de elasticidad también tienen relación con el incremento de la presión arterial durante el envejecimiento, en el que se producen fragmentación y calcificación de la elastina y fibrosis vascular por la acumulación de colágeno (8). Adicionalmente, a medida que la pared muestra mayor endurecimiento, se requiere de mayor energía para mantener el gasto cardíaco y se produce un aumento en el consumo de oxígeno por el miocardio, lo que produce una hipertrofia de la pared del miocardio.

1.5. Óxido nítrico (NO)

Dentro de las características del NO, se tienen las siguientes: es un gas inestable, liberado de una forma pulsátil, es muy lábil, contiene un electrón que no está apareado y tiene una vida media que dura aproximadamente seis segundos y es el mediador más importante que se presenta en la relajación vascular. La síntesis del NO esta mediada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), enzima a cargo de sintetizar NO y Lcitrulina a partir de L-arginina; para lo cual, se requieren los siguientes cofactores nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NAD(P)H], flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), tetrahydrobiopterina (BH₄) y CaM (31). Ante la existencia de un déficit de sustrato u oxidación de cofactores como BH₄, esta enzima óxido nítrico sintasa puede generar anión superóxido (O₂⁻) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂). A su vez, la interacción entre NO y O₂ – provocando la formación de peroxinitrito (ONOO⁻), que es una especie altamente reactiva (31).

El NO se puede sintetizar por 3 diferentes isoformas del NO sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS), la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS). Las isoenzimas, la nNOS y la eNOS tienen el nombre de constitutivas, y ambas dan respuesta a los agonistas bradicidina y acetilcolina (ACh) que generan un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular., estas isoenzimas producen NO por pequeños periodos de tiempo. La isoforma inducible (iNOS) se expresa en macrófagos y las células del endotelio, en repuesta a procesos inflamatorios, sintetizan más NO que las sintasas constitutivas, produciéndolo de una manera constante y por extensos periodos de tiempo. La síntesis de NO depende

también de la unión de la NOS a la CaM, para cuyo fin requieren un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Existe otro mecanismo fisiológico importante que se encarga de la producción de NO, éste es la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo al circular por los vasos. Otra característica del NO es que es liposoluble y atraviesa las membranas celulares, es decir el NO difunde del endotelio a las células del MLV adyacente de esta manera activa a la enzima GSc, provocando un aumento de los niveles celulares de GMPC, que provoca una disminución de la concentración de Ca^{2+} , elemento necesario para la interacción de las proteínas contráctiles, por lo cual produce vasodilatación.

La función endotelial puede ser evaluada de forma indirecta a través de la determinación de la relajación dependiente del endotelio, que está referida a la capacidad que posee el endotelio de liberar sustancias vasoactivas que actúan sobre las células del MLV, como respuesta a los estímulos como la acetilcolina. Esta actividad se debe a la producción de NO, la producción de NO a nivel endotelial es controlada por la eNOS, enzima que se encuentra sometida a una regulación tanto de tipo transcripcional, así como postranscripcional, la región que promueve el gen que codifica para esta enzima presenta diversos elementos desde los de respuesta a condiciones de flujo (*shear stress response element*, SSRE), hasta aquellas regiones que son potencialmente mediadoras de regulación por niveles de colesterol, lo que brinda una idea de lo complejo que se muestra su regulación. La disminución de la dilatación que depende del NO se considera la manifestación más temprana de la disfunción endotelial, la cual se produce anteriormente a que se aprecien alteraciones morfológicas y se considera como la primera función que mejora con ciertos tratamientos farmacológicos. El efecto antiproliferativo del NO parece que se encuentra relacionado con la represión producida por el NO de la transcripción de genes como la ciclina A, un regulador clave de la transición entre la fase G1 y S de la fase de replicación del ADN del ciclo celular. El NO también regula la integridad del endotelio de forma coordinada con el factor de crecimiento endotelial vascular, por ello el NO es considerado como el sensor más sensible y específico para evaluar la función endotelial (32).

Por tal motivo, en base a la fisiología, es fundamental la liberación de NO, el cual logra que se mantenga el tono del MLV, regulando la distribución del flujo sanguíneo en los lechos vasculares y tiene participación en la regulación necesaria para la resistencia periférica contribuyendo, de esta manera, al control de la presión arterial. Adicionalmente, el NO posee propiedades vasoprotectoras y antiateroscleróticas, puesto que inhibe la agregación y adhesión plaquetaria en la pared vascular (32). En el endotelio, este mediador sintetiza mediante la acción de la eNOS, tanto en condiciones basales como tras su activación por diversos agonistas o por el rozamiento producido por el flujo sanguíneo. Se ha demostrado que el NO participa en la relajación dependiente de endotelio inducida por bradicinina y ACh en diferentes lechos vasculares (23). Asimismo, modula las respuestas vasoconstrictoras inducidas por diferentes agonistas, como fenilefrina y noradrenalina (32). Una vez que se sintetiza, el NO difunde a la capa media sobre la cual produce vasodilatación mediante mecanismos, dependientes e independientes de GMPc. Por un lado, el NO activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la subsiguiente producción de GMPc, que es el principal mecanismo intracelular, por tal motivo, el NO produce un buen nivel de relajación. Éste activa a la PKG que gatillará diversas reacciones de fosforilación que en última instancia generan la relajación de las células del MLV, lo cual es consecuencia de la disminución de Ca^{2+} intracelular y se reduce la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil. También el NO provoca relajación por activar directamente canales de K^{+} mediante la hiperpolarización de la membrana, lo cual conduce a una inhibición de la entrada de Ca^{2+} en el espacio extracelular mediante los canales de Ca^{2+} que dependen del voltaje (32).

1.5.1. Fuentes farmacológicas y endógenas del óxido nítrico

El óxido nítrico, derivado del endotelio es determinante como lo hemos dicho, del tono vascular. Químicamente es un radical gaseoso libre muy reactivo y altamente lipofílico, que puede ser formado tanto por síntesis endógena esto es, catalizado por un tipo de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOs), o como consecuencia del metabolismo de drogas nitrato vasodilatadoras orgánicas. Estas drogas, las cuales incluyen agentes cardiovasculares tan importantes como la nitroglicerina,

dinitrato de isosorbide y nitroprusiato de sodio son degradadas para formar NO por modelos enzimáticos y no enzimáticos pobremente entendidos. El NO ha tenido un rol importante en terapias cardiovasculares por cientos de años, así la nitroglicerina y drogas de nitrato orgánico fueron usadas en el tratamiento de la angina de pecho desde inicios del siglo XX.

En 1950, los farmacólogos descubrieron que la nitroglicerina y las drogas de nitrato orgánico relajaban a las células del músculo liso de diversos tejidos incluyendo los vasos pulmonares y del intestino. Más tarde en 1970, se descubrió que esas drogas eran productos que al ser degradados en el organismo, daban como resultado un metabolito activo que no era otro que el óxido nítrico.

Otros estudios, demostraron en 1980 que el NO también era sintetizado por poblaciones neuronales específicas en el cerebro, por lo que se propuso su rol como neurotransmisor. Así, en 1991 y 1992 diferentes laboratorios aislaron una familia de enzimas (NO sintetasas) que elaboran NO, las cuales fueron purificadas, clonadas y caracterizadas en tres distintos tipos de NOs.

1.5.2. Mecanismo de acción

El óxido nítrico difunde libremente desde el citoplasma de las células endoteliales hacia las células vecinas musculares lisas, en las que penetra por difusión simple. Una vez en la célula muscular, actúa directamente sobre la enzima guanilato ciclasa soluble, responsable de la formación de la guanosina monofosfato cíclico (GMPc), a partir del GTP. Este mecanismo es diferente a otras moléculas que previamente deben unirse en forma específica a un receptor de membrana. El tiempo de acción del NO es fugaz, ya que subsiste sólo 5 a 10 segundos antes de ser oxidado a nitritos y a nitratos.

El GMPc generado actúa como segundo mensajero dentro de la célula muscular, inactivando vía fosforilación, a la kinasa de la cadena ligera de la meromiosina (MLCK), gracias a una proteína kinasa dependiente de GMPc. La MLCK inactiva, no permite la fosforilación de la cadena ligera de miosina, condición previa

indispensable para que se desplace la actina sobre la miosina durante la contracción produciéndose en su lugar, relajación muscular.

La acetilcolina (ACh), neurotransmisor del sistema parasimpático, actúa a nivel de la aorta como un agente vasodilatador a través de sus receptores muscarínicos del tipo M_3 . Está bien establecido, que el complejo ACh-receptor difunde por el plano de la membrana y toma contacto con la subunidad α de una proteína G específica. La subunidad α se disocia de las otras subunidades (β y γ), difunde por la bicapa hasta unirse y activar a la fosfolipasa C, esta última, hidroliza al fosfatidilinositol difosfato (PIP_2) produciéndose dos metabolitos. Uno la cabeza polar del fosfolípido denominado inositol trifosfato (IP_3) mientras que el resto de la molécula permanece en la hoja interna de la bicapa como 1,2 diacilglicerol (DAG).

El IP_3 induce la apertura de canales de calcio presentes en el retículo endoplásmico de la célula endotelial. El aumento de la concentración citosólica de este ion, le permite unirse a la proteína calmodulina, que al cambiar de conformación, es capaz de activar a la NO sintasa constitutiva, produciéndose finalmente óxido nítrico.

Hasta donde hoy se conoce, es la vía del NO la que utiliza la ACh para su efecto vasodilatador. Es importante igualmente reconocer, que sus efectos difieren, de acuerdo con el lecho vascular: Así, en la arteria aorta, la ACh promueve una respuesta relajante tal como lo señalamos anteriormente, siempre y cuando el endotelio este intacto; sin embargo, el efecto se transforma en una vasoconstricción paradójica en aortas de pacientes con enfermedad aterosclerótica (disfunción endotelial) (3).

1.5.3. Déficit de la síntesis endógena del óxido nítrico

Un déficit en la síntesis endógena del NO es responsable de enfermedades como la hipertensión arterial esencial o la enfermedad coronaria. A nivel respiratorio, se ha demostrado una disminución en la producción de NO por parte del endotelio

pulmonar, en casos de hipertensión pulmonar hipóxica, en la hipertensión presente debido a enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, en la fibrosis quística como también en pacientes con síndrome de Eisenmenger.

En la insuficiencia renal crónica, la acumulación de inhibidores endógenos de la síntesis del NO, contribuye a la hipertensión arterial junto a la depleción de las defensas propias de estos pacientes. Se ha demostrado igualmente, que existe una disminución en la síntesis de óxido nítrico en los vasos umbilicales de las pacientes que presentan hipertensión inducida por el embarazo.

De igual manera, el NO representa un papel muy relevante en la erección peneana, por lo tanto, la impotencia masculina podría deberse a una disminución en la síntesis de óxido nítrico por esos vasos sanguíneos. Por otro lado, en enfermedades tales como el hipercolesterolemia familiar y la diabetes mellitus, se ha demostrado la presencia de disfunción endotelial.

En el tracto gastrointestinal, la liberación de óxido nítrico por las terminaciones no adrenérgicas, permite la adaptación a la dilatación gástrica, diferenciándose de las enfermedades con déficit en la enzima óxido nítrico sintasa.

1.6. Óxido nitroso N₂O

1.6.1. Origen

El óxido nitroso, protóxido de nitrógeno o gas hilarante que es el gas anestésico más antiguamente empleado. Fue descubierto por Presley en el año 1776, hasta que se descubrieron sus propiedades anestésicas en 1844. Aconteció que cuando salía de un famoso circo, el Barnum, en la ciudad de Boston, el dentista norteamericano Horacio Wells se encuentra con una persona que inhalaba el famoso *gas de la risa* (era el óxido nitroso). El sujeto se encontraba en pleno ataque de risa, cuando tropieza con una silla y se lastima fuertemente en una pierna sin mostrar ningún signo de dolor. Al siguiente día, el astuto dentista le pide a un colega que le extraiga una muela mientras aspira algo de gas hilarante. La

operación culmina sin ningún tipo de dolor y no genera complicación alguna. Horacio Wells inicia una serie de experimentos, con gran éxito y con el fin de demostrar a la comunidad científica, su descubrimiento. Lamentablemente, al momento de llevar a cabo una extracción públicamente, algo se sale de control, al parecer hubo una mala regulación en la administración del gas y el paciente se levanta profiriendo terribles alaridos. Fue el dentista de Boston, William Murtón, quien, en dos años posteriores a este hecho, se llenaría de éxito al lograr la primera cirugía sin dolor utilizando el óxido nitroso frente a un grupo de médicos reconocidos. A partir de esta demostración, muchos de los principales laboratorios farmacéuticos se dedicaron a investigar las propiedades anestésicas de diversos gases y líquidos volátiles (3).

1.6.2. Química

Identificación

El Óxido Nitroso es un gas volátil

Composición

Su fórmula química es N_2O

Formas de Adulteración

Debido a que no existe un mercado negro de este producto, adquirirlo en establecimientos farmacéuticos garantiza que no hay posibles formas de adulteración

1.6.3. Farmacocinética

El óxido nitroso (N_2O) es muy insoluble en la sangre y otros tejidos y ello permite la distribución de equilibrio rápido y concentraciones anestésicas en alveolos y logra la inducción rápida de la anestesia y la recuperación acelerada del conocimiento, una vez que se interrumpe su administración. La captación rápida de óxido nitroso de gas alveolar permite concentrar los anestésicos halogenados

administrados simultáneamente; dicho efecto (de “segundo gas”) acelera la inducción de la anestesia. Una vez que se interrumpe la administración del óxido nitroso, este gas difunde de la sangre a los alveolos y diluye el oxígeno en los pulmones, situación que puede generar un efecto llamado hipoxia por difusión. De todas maneras, aun para producir grados menores de anestesia la mezcla del gas debe realizarse con oxígeno y no con aire que contiene demasiado poco oxígeno para evitar la hipoxia. Prácticamente todo el óxido nitroso absorbido (99.9 %) se elimina sin cambios por los pulmones (3).

1.6.4. Usos Clínicos

El óxido nitroso es un anestésico débil que posee notables efectos analgésicos, produciendo una buena amnesia y analgesia. La profundidad de la anestesia quirúrgica se alcanza solamente en situaciones hiperbáricas. A diferencia de ello, se logra la analgesia en concentraciones incluso de 20%.

El óxido nitroso se utiliza a menudo en concentraciones cercanas a 50% para obtener analgesia y sedación leve en técnicas odontológicas ambulatorias.

No se puede utilizar en concentraciones mayores 80% porque limita el aporte adecuado de oxígeno; ante tal limitación el óxido nitroso se usa como complemento de otros anestésicos por inhalación o IV.

El óxido nitroso es el más inocuo de los anestésicos generales si se emplea con suficiente concentración de oxígeno y no posee prácticamente contraindicaciones

1.6.5. Efectos psicológicos y fisiológicos

Mediante la aplicación de pequeñas dosis del óxido nitroso, se producen efectos psicológicos tales como la supresión de la sensación de dolor y la característica hilaridad. La persona que lo consume, puede mostrar un rostro sonriente presentar un ataque de risa incontrolable. Con dosis medianamente intensas, que se suministran mediante aspiraciones más profundas, se puede experimentar una primera etapa en la que se muestra excitación cordial, tal como sucede con las

bebidas alcohólicas, que seguidamente se transforman en sedación y sopor. Usado para fines extra-médicos, el usuario pretende lograr ambos efectos; el primero le brinda audacia y el segundo afecta sus pensamientos, lo cual se asocia con la pérdida del sentido crítico.

Los efectos fisiológicos que produce este fármaco son similares a los de otros anestésicos inhalables: reducen la presión arterial, el ritmo cardiaco y respiratorio, afecta también la circulación hepática y renal. La toxicidad producida por el óxido nitroso proviene de inhibir la producción de glóbulos blancos en la médula espinal (33).

1.6.6. Receptores Adrenérgicos

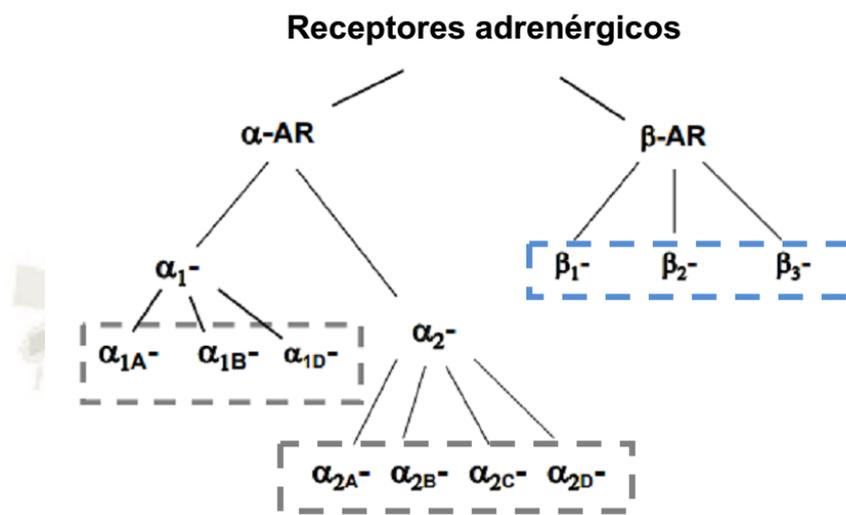
El funcionamiento del sistema simpático sería imposible si no existiera la participación de moléculas con la capacidad de reconocer la estimulación que presenta el medio ambiente, estas moléculas son denominadas como receptores adrenérgicos, éstos se clasifican como glicoproteínas, puesto que siempre se hallan localizadas en la membrana celular (3) y que dan respuesta a los agonistas adrenérgicos fisiológicos noradrenalina y adrenalina formando parte de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) las 5 cuales enlazan guanosina trifosfato (GTP), de esta manera quedan activadas (34).

1.6.7. Subfamilias de Receptores Adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos se clasifican en dos grandes familias o tipos, éstos son los receptores alfa adrenérgico (α AR) y los receptores beta adrenérgicos (β AR). Cada familia de receptor adrenérgico está subdividida en, al menos, 2 subtipos. De tal forma que los receptores α se subdividen en $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y los β AR se subdividen en $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$; finalmente, se considera una subdivisión de los subtipos α AR dividiendo los $\alpha 1$ en $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$, mientras que los $\alpha 2$ se dividen en $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$ y $\alpha 2D$ (35).

Figura N° 2

Clasificación de los receptores adrenérgicos, se remarca en color azul los receptores beta adrenérgicos, tema de estudio de este trabajo.



Nota. Tomado y modificado de Woodcock (35).

1.6.8. Receptores Beta Adrenérgicos

Los GPCR tienen la característica estructural común de tener 7 regiones transmembranales, lo cual permite la formación de tres horquilla o *loops* fuera de las células y tres dentro de las células, estas horquillas tienen importancia porque es ahí donde se encuentran sus lugares de regulación, por ejemplo, en la tercer horquilla extracelular se presenta el lugar de unión al ligando y en la tercer horquilla intracelular se encuentra el lugar de unión a la proteína G, ésta puede ser de diferentes clases que dependen de la función que sea necesario realizar, pudiendo ser Gs o Gq para efectos excitatorios o Gi para efectos inhibitorios (36).

Los tres subtipos de βAR se diferencian entre sí debido a sus características estructurales y farmacológicas, éstas se encuentran distribuidos de manera amplia en el organismo, en el cual llevan a cabo diferentes funciones que dependen del tejido en el cual se encuentren; En forma general se considera que el subtipo β1 es encontrado principalmente en el corazón, ocasionando efectos excitatorios

tales como el aumento en la frecuencia y aumento en su fuerza de contracción, el subtipo β_2 predomina en el músculo liso vascular causando vasodilatación y, finalmente, el subtipo β_3 predomina en el tejido adiposo (3), para tener una visión más detallada de la distribución y función de estos receptores ver la tabla 3 que se presenta a continuación:

Tabla N° 3:
Predominio y función de los subtipos de receptores beta adrenérgicos en diversos órganos y tejidos del organismo.

Estructura	Receptor predominante	Efecto
Músculo liso	β_2	Relajación
Endotelio	$\beta_{3>2}$	Liberación de óxido nítrico
Corazón	β_1	Efecto inotrópico positivo
		Efecto cronotrópico positivo
Hígado (Hepatocitos)	β_2	Aumento de glucógenolisis y gluconeogénesis
Músculo esquelético	β_2	Captación de potasio y glucógenolisis
Islotes de Langerhans (células beta)	β_2	Aumento en la secreción de insulina
Glándula pineal	$\beta_{1=2}$	Estímulo de síntesis de melatonina
Adipocitos	β_3	Lipólisis y termogénesis

Nota. Tomado de Gilman y Goodman (3).

1.7. Antecedentes de la Investigación

Hai-Yan et. al. (37), en el artículo “La vía de dos enzimas vincula la l -arginina con el óxido nítrico en la biosíntesis de N –nitroso” plantean que el óxido nítrico (NO) tiene una amplia variedad de funciones en biología, pero se sabe menos sobre su función en la creación de diversidad química. Se informa una nueva ruta hacia el NO desde la vía biosintética hasta el compuesto N -nitroso estreptozotocina. Se muestra que el grupo N -nitroso de la estreptozotocina proviene del re ensamblaje biosintético de la l -arginina, con los nitrógenos guanidina formando un enlace nitrógeno-nitrógeno. Para comprender este proceso biosintético, se identificó el grupo de genes

biosintéticos de estreptozotocina y demostramos que la l -arginina libre es *N* -metilada por StzE para dar *N*^o -monometil- l-arginina. Se muestra que este producto luego es oxidado por StzF, una enzima dependiente de hierro no hemo no relacionada con las sintasas de óxido nítrico conocidas, generando un compuesto de urea y NO. El trabajo implicó que la formación y captura de NO es la ruta probable para la formación de *N*-nitroso in vivo. En conjunto, el trabajo revela un nuevo par de enzimas para la producción de NO a partir de l-arginina y sienta las bases para comprender las rutas biosintéticas a los productos naturales de *N*-nitroso.

Pirahanchi et al. (38) en su artículo El factor relajante derivado del endotelio (EDRF) es un vasodilatador endógeno que las células endoteliales producen y luego liberan en respuesta a varios cambios en los cambios fisiológicos y fisiopatológicos normales. EDRF hace que el músculo liso vascular se relaje, ya que activa la guanilato ciclasa soluble y, posteriormente, aumenta el monofosfato de guanilato cíclico en el músculo liso vascular. El EDRF está estructuralmente en forma de óxido nítrico (NO) o de un compuesto que contiene óxido de nitrógeno. EDRF se forma a partir de L-arginina por una enzima que depende de calcio-calmodulina y NADPH. EDRF sirve como inhibidor de la agregación y adhesión de las plaquetas y es un vasodilatador. EDRF también sirve como segundo mensajero para la activación de la guanidil ciclasa y la producción de GMP cíclico. La función, la fisiopatología y la función de EDRF.

Moreno y Paz (39) en el artículo Efecto Vasodilatador Mediado por Óxido Nítrico del Extracto Hidroalcohólico de *Zea mays* L. (maíz morado) en anillos aórticos de rata, tienen como objetivo analizar la respuesta vasodilatadora e inhibidora de la vasoconstricción del extracto hidroalcohólico de *Zea mays* L. (maíz morado) y establecer si esta respuesta se encuentra mediada por óxido nítrico (NO). Se logró obtener un extracto de las corontas de maíz morado, que se maceraron durante ocho días en etanol al 70%, y posteriormente se realizó la concentración del producto. Se realizó el trabajo con anillos aórticos de rata en cámara de órganos aislados, que fue bañada con solución Krebs-Hensleit (K-H) y se realizó un registro de la actividad vasomotora con un transductor de tensión isométrica. Se produjo una contracción basal con KCl 120 mM respecto a la cual determinó el efecto vasodilatador de tres

dosis del extracto: 0,1; 0,5 y 1,0 mg/mL. Se utilizó L-NG-Nitroarginina metil ester (L-NAME) para realizar la comprobación de que la vasodilatación depende del óxido nítrico sintasa (NOs). seguidamente, se hizo una comparación de la inhibición de la contracción vascular tras la incubación durante 30 minutos, con extracto de maíz morado y captopril 10-5 M. En los resultados se pudo observar una reducción de la contracción máxima (100%) a $85,25 \pm 2,60\%$, $77,76 \pm 3,23\%$ y $73,3 \pm 4,87\%$, al aplicarse las dosis de 0,1; 0,5 y 1,0 mg/mL, respectivamente. La vasodilatación se inhibió por la incubación previa con L-NAME. El extracto de maíz morado no pudo inhibir la contracción vascular, a diferencia del captopril (reducción a $75,27 \pm 8,61\%$). Se concluye que el extracto hidroalcohólico de Zea mays L produce la vasodilatación dependiente de la síntesis de NO.

Marchio (40) en su tesis doctoral “Efecto del entrenamiento físico sobre los factores endoteliales en el sistema arterial de conejo” presenta como objetivo de la investigación, estudiar el efecto que produce el entrenamiento físico sobre la respuesta vascular y la función endotelial, haciendo un énfasis en la manera como participan los factores relajantes que se derivan del endotelio. Para la ejecución de la investigación, se usaron muestras de conejos macho, raza White New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) que tenían un peso promedio inicial de 2000 ± 110 g y un peso promedio final de 3500 ± 350 g, tabulados en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. La etapa experimental se llevó a cabo entre el año 2009 y el año 2014 respecto a un total de 97 especímenes. Éstos animales se dividieron en dos grupos, uno que no fue entrenado y otro que fue sometido a una rutina de entrenamiento físico (104). Todos los especímenes se estabularon en celdas individuales y se alimentaron ad libitum con pienso y agua. Antes de ser sacrificado, a cada conejo se le extrajo una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja, las muestras se recolectaron en tubos con EDTA para realizar la determinación plasmática de NOx, de L-arginina y de ADMA. Las muestras fueron centrifugadas por un lapso de 10 minutos a 2000 rpm y el plasma se almacenó a -20°C hasta que fue utilizado para las determinaciones bioquímicas. El procedimiento fue experimental. Al término de la investigación, se llegó a la conclusión de que en la

arteria carótida, el ejercicio físico crónico disminuye la relajación a la acetilcolina por disminuir la biodisponibilidad de NO. Este efecto puede ser compensado, probablemente con cambios estructurales efectuados en el músculo liso que generan una disminución de su capacidad contráctil.

Del Castillo (41) en su tesis doctoral “Incremento de la relajación no dependiente del endotelio por efecto del estradiol sobre la actividad del ion calcio en anillos aórticos de rata con disfunción endotelial” desarrolla su interés científico respecto al papel de las hormonas sexuales en la aparición o en la inhibición de las diferentes etapas de la aterogénesis. La disfunción endotelial es un procedimiento acelerado, que se presenta desde el inicio de la aterosclerosis y, participa en su evolución y complicaciones las hormonas sexuales siendo por ello, de suma importancia en la investigación clínica. La terapia estrogénica genera un incremento en la bioactividad del óxido nítrico (NO) que protege el endotelio en el sistema vascular de las mujeres posmenopáusicas con buena salud. No se tiene claro el papel que tienen los estrógenos en la disfunción endotelial que se presenta en la relajación no dependiente del endotelio cuando es inducida con nitroglicerina. Es por tal motivo, que su estudio es indispensable y conduciría a un uso beneficioso de la terapia en la cual se usa el reemplazo hormonal para la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Bajo este criterio, la investigación tuvo como propósito, estudiar si el deterioro de la función vascular, en particular, la disfunción endotelial que se observó durante la vasodilatación no dependiente del endotelio, se podría revertir mediante la administración de estrógenos (E2) en tejido aórtico de ratas.

El objetivo general de dicha tesis fue demostrar como el estradiol ayuda en la disminución del deterioro de la relajación no dependiente del endotelio presente en aorta de ratas hipercolesterolémicas gracias a la reducción de la actividad del ion calcio en la célula muscular lisa. El presente estudio es de tipo experimental. La muestra biológica estuvo constituida por anillos aislados de aorta torácica extraídos de 27 ratas albinas de la cepa Sprague Dawley los cuales se dividieron en dos grupos aleatoriamente: uno. Grupo Hipercolesterolémico constituido por 22 animales y un segundo, Grupo Normal, conformado por 5 ratas. Las aortas torácicas disecadas,

fueron seccionadas en anillos y estudiadas en una cámara de órganos empleando en el medio, noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh), óxido nítrico (NO), estradiol, nifedipino y ketamina, para evaluar su reactividad (respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora). Los resultados obtenidos, permitieron concluir que la administración orogástrica del cóctel lipídico por 40 días en este modelo murino, indujo hipercolesterolemia experimental y consecuente a ello, se redujo viii significativamente la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio (disfunción endotelial) de los anillos aórticos aislados en respuesta a ACh administrada al baño de órganos. De manera similar, la preincubación con L-N Metil Arginina (L-NAME) disminuyó la vasodilatación inducida por acetilcolina demostrando su efecto bloqueador de la síntesis de NO en la célula endotelial. Resultado de la eliminación del endotelio, los anillos respondieron con un deterioro significativo de su actividad vasodilatadora ($p < 0.01$) frente a la administración al baño de órganos de óxido nítrico (vía no dependiente del endotelio) la cual no se manifestó, cuando fueron previamente incubados con 17β -estradiol ($3,0\mu\text{M}$). Similar efecto se observó cuando, además se añadió al medio de incubación nifedipino demostrándose así, que ambas drogas podrían tener el mismo mecanismo de acción. Por el contrario, la preincubación de los anillos disfuncionantes con ketamina con o sin 17β -estradiol redujo de manera similar la magnitud de la contracción inducida con NA proponiéndose por ello, poseer diferentes mecanismos de acción.

Kobayashi et al. (42) en su artículo “Regulación molecular de la masa muscular esquelética y el aporte de óxido nítrico: una revisión” realizan el estudio de una variedad de factores internos y externos como el ejercicio, la nutrición, la inflamación y la caquexia asociada con el cáncer afectan la regulación de la masa muscular esquelética. Debido a que el músculo esquelético funciona como un regulador crucial del metabolismo de todo el cuerpo, en lugar de solo como un motor para la locomoción, se requiere mejorar y mantener la masa y la función muscular para mantener la salud y reducir la morbilidad y mortalidad asociadas con enfermedades que involucran atrofia muscular. Los estudios recientes en este campo han hecho un gran progreso; por lo tanto, la identificación de los mecanismos que regulan la masa

muscular esquelética es necesaria para el manejo físico y nutricional tanto de los atletas como de los pacientes con atrofia muscular. En esta revisión, se presenta un panorama general de las interacciones que regulan la masa muscular esquelética, centrándose particularmente en la vía del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I)/insulina-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR), la inactividad del músculo esquelético y el ejercicio de resistencia y resistencia. También se discute la contribución del óxido nítrico (NO) a la regulación de la masa muscular esquelética en base al conocimiento actual del papel novedoso del NO en estos procesos.

Kang (43) en el artículo “Factores relajantes derivados del endotelio de las pequeñas arterias de resistencia en la hipertensión” explica como los factores relajantes derivados del endotelio (EDRF), como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y el (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), desempeñan un papel fundamental en la regulación del tono vascular. La reducción de los EDRF provoca un deterioro de vaso relajación dependiente del endotelio, o disfunción endotelial. El deterioro de vaso relajación dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina (ACh) se observa sistemáticamente en los vasos del conducto en pacientes humanos y en modelos animales experimentales de hipertensión. Dado que pequeñas arterias de resistencia se saben que producen más de un tipo de EDRF, el mecanismo o mecanismos que median vaso relajación dependiente del endotelio en las arterias de resistencia pequeñas puede ser diferente del observado en los vasos de conducto en condiciones de hipertensión, donde la vasorelajación depende principalmente del NO. EL EDHF se ha descrito como uno de los principales mediadores del vaso relajación dependiente del endotelio en las pequeñas arterias de resistencia en animales normotensos. Además, el EDHF parece convertirse en el principal dependiente del endotelio cuando la vía de la NO sintasa endotelial (NOS3) /NO está ausente, como en los ratones NOS3-knockout, mientras que algunos estudios han demostrado que la vía del EDHF es disfuncional en modelos experimentales de hipertensión. En este artículo se revisan los conocimientos actuales sobre EDRF en las arterias pequeñas en condiciones de normotensión e hipertensión. Un mayor conocimiento de los diferentes mecanismos de vaso relajación en las arterias pequeñas en condiciones de

hipertensión ayudará a los médicos a identificar los objetivos adecuados para tratar la disfunción endotelial en los pacientes hipertensos.

Ogoshi et. al. (44) en el artículo “Función protectora de las sintasas de óxido nítrico mielocíticas contra la hipertensión pulmonar hipóxica en ratones” tuvo como objetivo determinar el papel de las NOS en las células de la MO en la HP. El método fue experimental y se realizaron estudios en 36 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y en tipo salvaje (WT), nNOS (NOS neuronal) $-/-$, iNOS (NOS inducible) $-/-$, eNOS (NOS endotelial) $-/-$ y n/i/eNOSs $-/-$ ratones. Como parte de los resultados principales se observó que, en los pacientes, hubo una correlación significativa entre la presión sistólica de la arteria pulmonar más alta y los niveles más bajos de nitrito más nitrato en el líquido BAL. En los ratones, la PH inducida por hipoxia se deterioró significativamente en el genotipo n/i/eNOSs $-/-$ y, en menor medida, en el genotipo eNOS $-/-$ en comparación con el genotipo WT. En el genotipo n/i/eNOSs $-/-$ expuesto a hipoxia, el número de células progenitoras de músculo liso vascular derivadas de MO circulantes fue significativamente mayor, y el trasplante de células MO transgénicas con proteína fluorescente verde reveló la contribución de las células MO al tejido vascular pulmonar. Es importante destacar que n/i/eNOSs $-/-$ El trasplante de -BM agravó significativamente la PH inducida por hipoxia en el genotipo WT, y el trasplante de WT-BM mejoró significativamente la PH inducida por hipoxia en el genotipo n/i/eNOSs $-/-$. Un total de 69 y 49 ARNm relacionados con la inmunidad y la inflamación, respectivamente, se regularon significativamente en los pulmones de ratones de genotipo WT trasplantados con n/i/eNOSs $-/-$ -BM en comparación con aquellos con WT-BM, lo que sugiere la participación de inmunidad, y mecanismos inflamatorios en la exacerbación de la HP inducida por hipoxia causada por el trasplante de n/i/eNOSs $-/-$ -BM. Se concluye que estos resultados demuestran que las n/i/eNOSs mielocíticas juegan un papel protector importante en la patogenia de la HP.

Zgheel et al. (45) en el artículo “EPA:DHA 6:1 es una formulación superior de PUFAs omega-3 atenuando las respuestas contráctiles inducidas por las plaquetas en la arteria coronaria porcina y la arteria mamaria interna humana por dirigirse a la vía de la

serotonina a través de un aumento de la formación endotelial de óxido nítrico”, evaluaron si los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3, conocidos por proteger el sistema vascular, son capaces de prevenir las respuestas contráctiles inducidas por las plaquetas en arterias aisladas y, en caso afirmativo, investigar el mecanismo subyacente y la importancia de la formulación de los PUFAs omega3. Se prepararon arterias coronarias porcinas (ACP), arterias mamarias internas humanas (AMI) y plaquetas humanas lavadas. Se prepararon plaquetas y se estudió la reactividad vascular en cámaras de órganos. En los anillos de PCA, las plaquetas agregadas provocaron contracciones dependientes de la concentración que fueron significativamente por el antagonista del receptor 5-HT_{2A} ketanserin, y por EPA:DHA 6:1 pero no con EPA:DHA 1:1 al 0,4% v/v. El EPA:DHA 6:1 también impidió las contracciones inducidas por el 5-HT inducidas por el 5-HT, pero sólo afectó ligeramente a las inducidas por el análogo del tromboxano A₂ U46619. El efecto inhibitorio del EPA:DHA 6:1 sobre las contracciones inducidas por las plaquetas no se observó en los anillos sin endotelio, y se evitó con un inhibidor de la eNOS pero no con inhibidores de la de la hiperpolarización dependiente del endotelio. En los anillos de IMA, el EPA:DHA 6:1 pero no el EPA:DHA 1:1 al 0,4 % v/v impidió significativamente la contracción inducida por el 5-HT, e indujo mayores relajaciones dependientes del endotelio que la bradiquinina y la acetilcolina sensibles a un inhibidor de la eNOS . El EPA:DHA 6:1 inhibe fuertemente las contracciones inducidas por las plaquetas y la 5-HT en los anillos PCA y las inducidas por la 5-HT en los anillos IMA, probablemente a través de un aumento de la formación endotelial de NO. Estos resultados sugieren que la formulación EPA:DHA 6:1 de los PUFAs omega-3 puede ser de interés para prevenir la lesión vascular inducida por las plaquetas en los sitios arteriales de disfunción endotelial.

Da Silva et al. (46) realizaron el artículo “Asociación de los polimorfismos del gen del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y los niveles de aptitud física con las concentraciones plasmáticas de nitritos y los valores de la presión arterial en adultos mayores”. Los polimorfismos del gen del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se

asocian a una reducción de la actividad de la eNOS y de la producción de óxido nítrico (NO), lo que provoca un aumento de la presión arterial (PA). El ejercicio regular es la principal estrategia para minimizar los efectos nocivos de los polimorfismos. Sin embargo, debido a las diferencias en la realización del ejercicio físico, se encuentran algunos resultados controvertidos. Por lo tanto, parece razonable evaluar el estado de entrenamiento (TS). Así pues, este estudio tuvo como objetivo investigar la asociación de los haplotipos del gen de la eNOS y los diferentes niveles de ST sobre las concentraciones de nitritos (NO₂⁻) y los valores de PA en adultos mayores. 424 ancianos realizaron las siguientes evaluaciones: Índice de Aptitud Funcional General (GFFI) para estimar la ST, presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD), extracción de sangre para el análisis de NO₂⁻ y polimorfismos g.-786T>C, intrón 4b/a (VNTR) y 894G>T. La regresión logística multivariante mostró que el NO₂⁻ estaba influido por el GFFI y el intrón 4b/4a. En cuanto a la PA, el GFFI influyó en la PAS y la PAD, y sólo el intrón 4 se asoció a las variaciones de la PAD. Se observa que el GFFI afectó al NO₂⁻, a la PAS y a la PAD independientemente de los haplotipos. Por lo tanto, el mantenimiento de un buen nivel de ST puede superar la influencia negativa de los factores genéticos (intrón 4) aumentando la concentración de NO₂⁻ y disminuyendo los valores de PA.

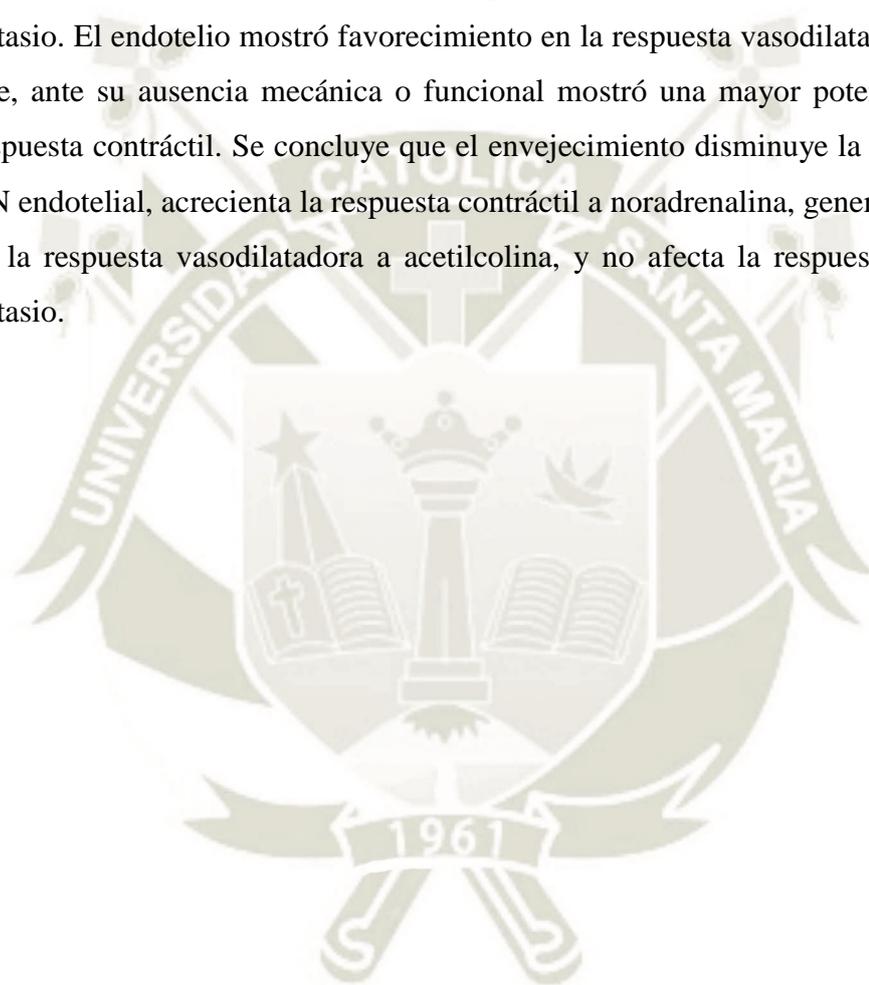
García et al. (47) en el artículo “Óxido nítrico. un nitro vasodilatador endógeno” tienen como objetivo ampliar el conocimiento respecto al óxido nítrico, y su uso como mediador químico orgánico y como un nitro vasodilatador endógeno que comienza a considerarse cada vez de forma más frecuente. El estudio presenta una reseña de la participación del óxido nítrico en complejos mecanismos como la hemodinámica, la hemostasia, la inflamación aguda, la transmisión sináptica, la respiración celular, etc. Mediante la investigación se pudo relacionar al óxido nítrico con la esfera de trabajo de muchas especialidades de la medicina y de la estomatología, que permita una mejor comprensión de los procesos que caracterizan a muchas entidades presentes en la práctica médica. Finalizando el estudio se llega a la conclusión de que sus efectos, a nivel orgánico, encontrados, así como su funcionamiento, lo convierten en un excelente vasodilatador endógeno a diferentes niveles o como una poderosa toxina

ante bacterias y células tumorales liberadas por los leucocitos. Su uso de forma inhalatoria abre una excelente opción a la terapéutica.

Benavides y Guenet (48), en el artículo “Modelos murinos de enfermedades humanas”, realizan una revisión bibliográfica de los estudios realizados sobre las mutaciones disponibles en el ratón de laboratorio, espontáneas, inducidas o las que han sido generadas por manipulación genética, que son utilizadas como modelo de enfermedades humanas. El trabajo que se ha desarrollado durante un siglo de investigaciones ha dado como resultado una gran cantidad de documentación referida a los fenotipos mutantes, las características de las cepas y los mapas genéticos. El estudio presenta como conclusión, que la colección de mutaciones del ratón, acumuladas en las décadas pasadas por los genetistas y bioteristas, representa una fuente valiosa de modelos animales para el estudio de los desórdenes genéticos humanos homólogos. En el futuro cercano, la disponibilidad de modelos murinos tendrá un incremento acelerado, debido a la gran cantidad de técnicas disponibles para el diseño de alteraciones en el genoma murino y los proyectos conjuntos de mutagénesis química por etil nitroso urea (ENU). La denominada era “pos-genómica” (“post-genomics” o “functional genomics”) está totalmente vigente entre nosotros y será de suma importancia poder contar con estos modelos animales, en la realización del estudio funcional de las secuencias obtenidas de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino. Se puede asegurar que la genética del ratón, así como la genética de los mamíferos, está en un proceso revolucionario en la medicina.

Pazos et. al. (49), en el artículo “Envejecimiento, reactividad vascular adrenérgica y síntesis de óxido nítrico en anillos de aorta de rata”, presenta como objetivo de la investigación, evaluar el efecto del envejecimiento sobre la respuesta vascular adrenérgica y su relación con la síntesis de óxido nítrico (ON) endotelial. El estudio se realizó mediante el método de Furchgott, mediante el montaje de preparaciones aisladas de cilindros de aorta de ratas de 10-12, 20-22 y > 40 semanas de edad. Se efectuó una evaluación de la respuesta contracción/relajación que fue inducida por adrenalina, acetilcolina y nitrito de potasio; ante la presencia y ausencia mecánica o funcional de endotelio y ante la ausencia y presencia de L-arginina como agente

facilitador de la síntesis de ON. Se corrieron curvas dosis-efecto acumulativas. Los resultados mostraron que la edad disminuyó en forma progresiva la capacidad del endotelio para producir ON y la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina, mostrando un incremento en la respuesta contráctil inducida por noradrenalina sin la visibilizarían de modificaciones en la respuesta vasodilatadora inducida por nitrito de potasio. El endotelio mostró favorecimiento en la respuesta vasodilatadora, mientras que, ante su ausencia mecánica o funcional mostró una mayor potenciación de la respuesta contráctil. Se concluye que el envejecimiento disminuye la producción de ON endotelial, acrecienta la respuesta contráctil a noradrenalina, genera disminución de la respuesta vasodilatadora a acetilcolina, y no afecta la respuesta a nitrito de potasio.



CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental, corte longitudinal.

2.2. Muestra

2.2.1. Unidades de Estudio

Unidad de estudio. *Rattus norvegicus* variación albinus línea Sprague-Dawley

Unidad de observación: Anillos aislados de aorta torácica

La muestra biológica se distribuirá de la siguiente manera:

- **Grupo Blanco:** conformado por 5 ratas, a los cuales se les administró una dieta normal (30g) y agua *ad libitum*. No se les indujo hiperglucemia con estreptozotocina en lugar de ello recibieron un placebo constituido por suero fisiológico. Una vez sacrificadas, se les disecó la aorta torácica la cual se seccionó en anillos (4 en total) de 4mm de longitud cada uno. Con los anillos procedentes de este grupo, se determinó los parámetros fisiológicos de contracción y relajación en una cámara de órganos aislados con 3 dosis crecientes de noradrenalina (0.1, 1.0 y 10.0 μ M) y 4 dosis crecientes de acetilcolina (0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 μ M) respectivamente.
- **Grupo Control:** conformado por 5 ratas, las cuales se les indujo hiperglucemia con estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (50mg/Kg de peso) en una sola dosis, para inducirles estrés oxidativo y con ello disfunción endotelial. Una vez sacrificadas se disecó la aorta torácica para seccionarla en anillos y someterlos a su estudio en la cámara de órganos. Este grupo de anillos, permitió observar el grado de disfunción endotelial inducido en

respuesta a 3 dosis crecientes de noradrenalina como vasoconstrictor y 4 dosis crecientes de acetilcolina como vasodilatador.

- **Grupo Experimental 1:** constituido por 5 ratas. De manera similar al grupo control, se les indujo disfunción endotelial y luego una vez sacrificadas se les disecó la aorta torácica para seccionarla en anillos, observando su respuesta vascular en la cámara de órganos. Todos los anillos aislados de las 5 ratas de este grupo, se les incubó durante 5 minutos con óxido nitroso previo a la observación de su efecto vasoconstrictor con 3 dosis crecientes de noradrenalina y posteriormente su respuesta vasodilatadora a 4 dosis crecientes de acetilcolina.
- **Grupo Experimental 2:** conformado por 5 ratas, de manera similar al grupo control se les indujo disfunción endotelial. Una vez sacrificadas se les disecó la aorta torácica para seccionarla en anillos observando su respuesta vascular en la cámara de órganos. Todos los anillos aislados de las 5 ratas de este grupo, se les incubó por un tiempo de 5 min con óxido nitroso para luego, observar su respuesta vasoconstrictora con un simpático mimético exógeno como la fenilefrina en tres dosis crecientes y posteriormente su respuesta vasodilatadora a 4 dosis crecientes de acetilcolina.

2.2.2. Muestra biológica

Como animales de experimentación se utilizaron 20 ratas albinas de ambos sexos de dos meses de edad, de la cepa Sprague-Dawley con un peso promedio de 250 ± 20 g, provenientes del bioterio de Centro de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín. Los animales se mantuvieron cada cuatro por cada jaula, a una temperatura de $21^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ con periodos de luz/oscuridad de 12hrs. El alimento suministrado diariamente a la misma hora, estuvo constituido por 30g de concentrado para mantenimiento de la marca TOMASINO® y agua *ad libitum*.

2.2.3. Muestra de estudio

La muestra de estudio estuvo constituida por anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas normo-glucémicas e hiperglucémicas (inducidas experimentalmente) distribuidos aleatoriamente según el protocolo de estudio.

2.3. Tiempo y duración del estudio

El estudio tuvo una duración de 6 meses distribuyéndose el tiempo de la siguiente manera:

- Las primeras 4 semanas permitieron la adaptación de los animales al ambiente del animalario (hacinamiento, manejo y manutención), así como la planificación de los tiempos de estudio y la práctica en el manejo de las cánulas y bolsa de óxido nitroso como también la obtención de los parámetros laboratoriales que constituyen el trabajo.
- Durante las siguientes 12 semanas se realizó la parte experimental propiamente dicha.
- Finalmente, el 3er y 4to mes fue de evaluación y análisis de los resultados obteniéndose las conclusiones respectivas sustentadas estadísticamente junto a la elaboración final del manuscrito.

2.4. Lugar de Experimentación

El trabajo de Investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Medicina (CIDEK-UNSA).

2.5. Recursos e Instrumentos

2.5.1. Recursos humanos

- Magister, QF.
- Asesor. Director del CIDEK-UNSA.

- Personal del Centro de Investigaciones

2.5.2. Recursos materiales

A) Equipos:

- Estufa de temperatura de 0 a 250°C
- Balanza analítica Marca TOLEDO, sensibilidad de 10⁻⁴g.
- Osmómetro.
- Agitador magnético con placa calentadora.
- Cámara de órganos aislados marca PanLab de 4 celdas.
- Termociclador con baño de María.
- PC de mesa con software incorporado
- Monitor para PC marca HP.
- Mesa de disección para roedores

B) Fármacos:

- Noradrenalina (Clorhidrato) anhidra (NA)
- Fenilefrina (FE) (agonista alfa adrenérgico).
- Acetilcolina (ACh).
- Óxido nitroso (N₂O) presentación en balón de gas

C) Material biológico:

- Segmentos (anillos) de aorta torácica de 20 ratas (80 anillos aproximadamente).

2.5.3. Recursos financieros

- Autofinanciado.

2.6. Diseño Experimental

2.6.1. Inducción de hiperglucemia en un modelo murino experimental

Existen varias clases de agentes químicos. Los primeros son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células β del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células β ; pero no las destruyen. Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia se produce la diabetes. Los agentes más utilizados son el aloxano y la estreptozotocina, estos compuestos en dosis diabéticas actúan específicamente sobre las células beta (50).

La estreptozotocina es una sustancia relativamente selectiva para las células beta, que en ciertas especies causa diabetes permanente. La fijación a la membrana, a semejanza con el aloxano, es el primer evento en el proceso patológico (50).

La hiperglucemia experimental se indujo por inyección en una sola dosis de 50 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina disuelta en 10mM de buffer citrato a pH 7,4, vía intraperitoneal después de 12 horas de ayuno.

2.6.2. Determinación de Glicemia

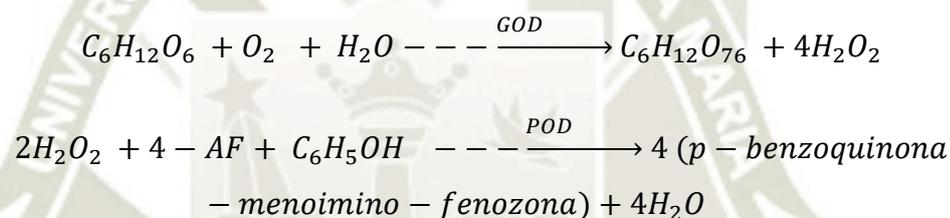
Se tomaron las muestras de sangre de la vena caudal de la cola del animal. Para ello, se seccionó el extremo distal de la cola (a 5mm) previa vasodilatación con radiación infrarroja obteniéndose aproximadamente 0.5ml de sangre (5 tubos capilares). Inmediatamente después empleando una centrifuga para capilares, se separó el suero procediéndose a su análisis.

2.6.2.1. Determinación de Glucosa en Suero

Fundamento:

La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa (GOD; D-glucosa: Oxígeno 1-oxidorreductasa; EC 1.1.3.4) a ácido glucónico y agua oxigenada: el agua oxigenada en presencia de peroxidasa (POD; donador: hidrógeno-peróxido oxidorreductasa; EC 1.11.1.7.) produce la copulación oxidativa del fenol con la 4 - aminofenazona (4 -AF) dando lugar a la formación de un cromógeno rojo - cereza con absorbancia máxima a 505 nm (51).

El esquema de reacción es el siguiente:



Se usa el método enzimático para la determinación de glucosa en suero de la siguiente manera:

- Se toma 10 microlitros del suero y se coloca en un tubo (de ensayo allí se le agrega 1ml. del reactivo de trabajo (el cual consta de GOD, reactivo 4-AF, reactivo fenol, agua destilada), luego se mueve suavemente, frotando el tubo entre las manos.
- Se incuba por 10 minutos a 37 °C (en Baño María). Cada vez que se prepara el reactivo de trabajo se coloca un tubo de ensayo que contiene el estándar, el cual sirve para hallar el factor de corrección.
- Se lee en un espectrómetro a 505 nm. llevando el aparato a cero con el blanco.
- Los datos obtenidos serán anotados en hojas de control.

2.6.3. Determinación del marcador de oxidación: malondialdehído (MDA)

A. Método de Determinación del MDA

Los niveles de lipohidroperóxidos se analizaron en suero, mediante la determinación del malondialdehído (MDA) (52).

Para ello 0,5 ml de suero, extraído mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos, se incubó con 2ml de una mezcla de ácido tricloroacético (15 % p/v), ácido tiobarbitúrico (0,37 %) y ácido clorhídrico (25 mol/L). La solución es calentada durante 20 min. en baño María a 100°C, para luego adicionarle 2,5 ml de n-butanol procediéndose a su centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se lee a 532nm contra un blanco de n-butanol (52).

La lipoperoxidación se expresó en términos de nM de MDA/mg de suero.

2.6.4. Obtención de la respuesta vasoactiva en anillos aislados de aorta torácica

2.6.4.1. Empleo de la cámara de órganos aislados

Los animales fueron sacrificados mediante contusión cervical. Luego de hacer una incisión preesternal para exponer la capa muscular de la región, se dislaceró para localizar la arteria aorta torácica. Una vez reconocida se la seccionó en su región torácica para extraerla y sumergirla en una solución Krebs Henseleit (KH) contenida en una placa Petri mantenida a 37°C con burbujeo continuo de una mezcla carbógena de 5% de CO₂ en 95% de O₂ empleando una aguja hipodérmica No 25. A continuación, se procedió a una cuidadosa disección para limpiar el vaso en toda su extensión eliminando la adventicia y el tejido conectivo periaórtico para luego, proceder a seccionarla mediante una guillotina en 4 anillos de 4mm de longitud cada uno.

Una vez obtenidos los anillos aislados, uno a uno se fue colocando en el pozo de la cámara de órganos aislados, insertándolos entre dos postes de acero inoxidable;

uno fijo en el fondo del pozo y el otro, constituido por el extremo terminal de un transductor de contracción isométrica que convirtió las señales mecánicas en señales eléctricas para ser manejadas mediante un software y hardware adecuados de un polígrafo marca PanLab. El procedimiento finaliza con el llenado del pozo de la cámara con solución KH con burbujeo continuo de la mezcla carbógena. La temperatura del baño se mantuvo fija a 37 ± 0.3 grados Celsius, gracias a la circulación de agua a esa temperatura por la doble pared de la cámara de órganos. La preparación así instalada se mantuvo por espacio de 60 minutos hasta su estabilización.

A. Determinación del patrón de contracción y relajación con los anillos de los animales procedentes del Grupo Blanco

Para estimar los límites tanto de contracción como de relajación en condiciones normales (fisiológicas) se trabajó con los anillos procedentes del grupo Blanco. Se inició el procedimiento, añadiendo a la solución Krebs Henseleit de la cámara de órganos aislados 3 dosis crecientes y sucesivas de noradrenalina (NA) (0.1, 1.0 y $10\mu\text{M}$) con lo que se observó la contracción del vaso a través del tiempo, graficándose una curva en el monitor del equipo. Al punto máximo de respuesta se lo denominó arbitrariamente como del 100% (máxima contracción fisiológica) el cual una vez alcanzado, se añadió al baño 4 soluciones con dosis crecientes de acetilcolina (ACh) (0.01, 0.1, 1.0 y $10\mu\text{M}$) con lo que se observó la curva de vasodilatación normal.

B. Demostración de la presencia de disfunción endotelial (incremento de vasocontracción y disminución de vasodilatación) mediante el estudio de los anillos procedentes de los animales del Grupo Control

Una vez instalados los anillos procedentes del Grupo Control con disfunción endotelial y estabilizada la preparación con la solución KH, se añadió al baño de 3 dosis crecientes y sucesivas de NA (0.1, 1.0 y $10\mu\text{M}$). Una vez alcanzado el punto máximo de contracción, se añadió sobre la solución de noradrenalina, 4 dosis crecientes de acetilcolina observándose la vasodilatación consecuente

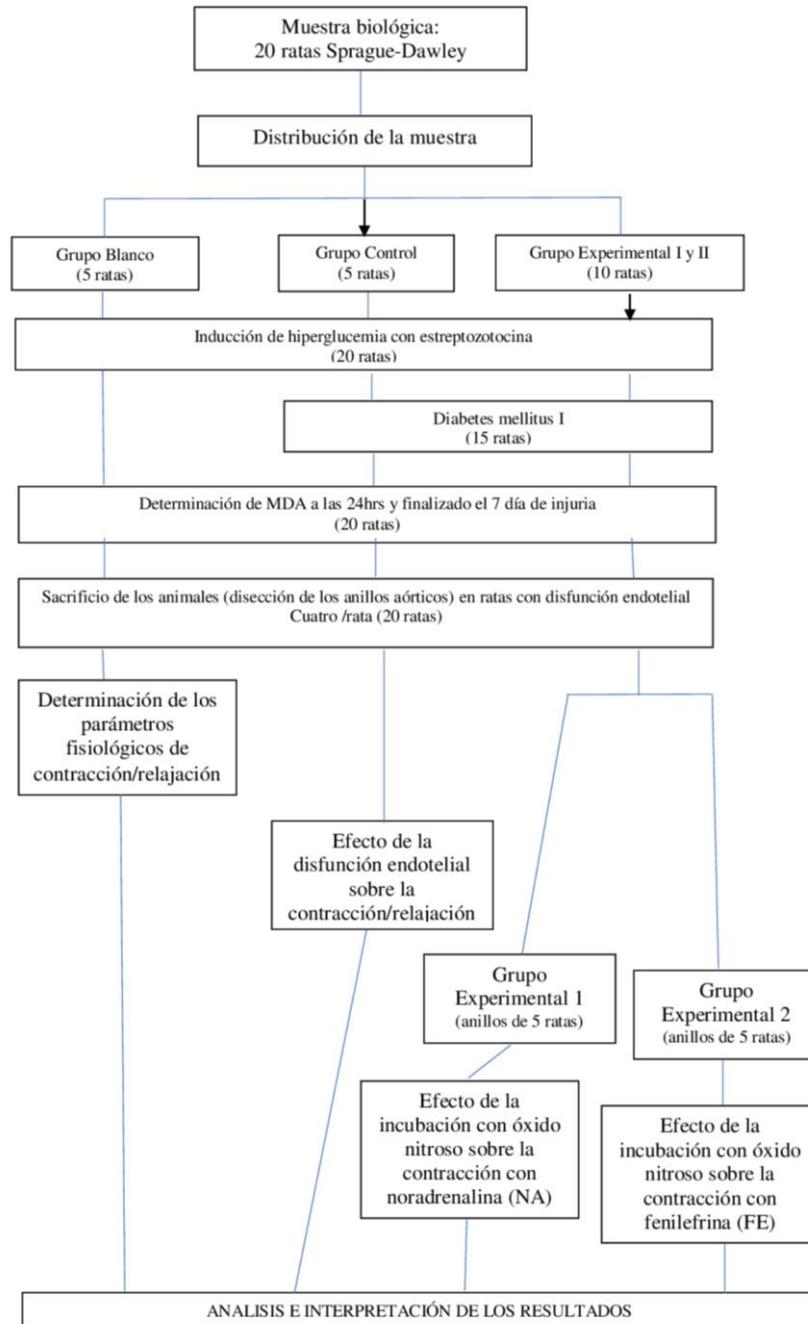
a través del tiempo, de la musculatura lisa del tejido aórtico. Obtenida la curva se la comparó con la curva normal obtenida con los animales sin hiperglucemia (Blanco) para su evaluación.

C. Efecto de la incubación con óxido nitroso sobre la disfunción endotelial (incremento de vasoconstricción) observada en los anillos aislados procedentes de los animales del Grupo Experimental 1 y 2.

Los anillos de aorta aislados procedentes de los animales del Grupo Experimental 1 y 2 se sometieron a un tratamiento previo a la obtención de su respuesta vasoconstrictora. Este consistió, en que una vez sumergidos e instalados en el pozo de la cámara con la solución KH, los anillos se sometieron no solamente al burbujeo con la mezcla carbógena sino y de manera simultánea mediante una segunda aguja hipodérmica, al burbujeo de gas óxido nitroso a la concentración de 300pp/millón. Después de 5min., recién se procedió a registrar la respuesta vasoconstrictora empleando noradrenalina (Grupo Experimental 1) o fenilefrina (Grupo Experimental 2) y posteriormente, una vez alcanzada la máxima contracción se determinó la respuesta vasodilatadora a 4 dosis de acetilcolina tal y como se realizó con el Grupo Control. El burbujeo de ambos gases, se mantuvo durante todo el procedimiento.

Para lograr la concentración de 300pp/millón de óxido nitroso en el medio (solución KH) del baño de órganos, se graduó el suministro del gas carbógeno a 38 burbujas/min mientras que la aguja que suministraba el óxido nitroso lo hacía a 20 burbujas/min. La regulación de la provisión de los gases garantizó que de manera simultánea la solución del baño de órganos contenga 35% (300pp/millón) de óxido nitroso y 65% de mezcla carbógena (O₂ más CO₂).

Figura N° 3
Diseño experimental



2.7. Diseño Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el paquete estadístico SAS: Statistical Analysis System, Raleigh, North Carolina Institute, INC.

Calculándose los siguientes estadígrafos:

- Medidas de tendencia central, media \pm desviación estándar.
- Se calculó el estadístico F de Friedman para más de dos muestras relacionadas, con un nivel de confianza del 95 %.
- Prueba Post Hoc de Bonferroni de Kruskal-Wallis, considerando un nivel de significancia del 95%.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

El concepto de disfunción endotelial ha surgido en las últimas décadas, como una alteración fisiopatológica precursora del proceso aterosclerótico. Patologías como hiperlipemia, hiperglucemia, HTA, etc. deterioran la respuesta inicial del endotelio vascular como sus funciones constitutivas, permeabilidad selectiva y capacidad biosintética. Se ha observado que inicialmente el endotelio produce una fase de adaptación transitoria, modificando las características de permeabilidad de su barrera, e incrementa a través de sus organelas como aparato de Golgi, retículo endoplásmico, etc. la síntesis de diversas sustancias. En otras palabras, el estado de equilibrio que mantiene la homeostasis vascular, va dejando paso a una fase de disfunción endotelial la misma que se caracteriza por desequilibrio en la producción de óxido nítrico que disminuye, y la de endotelina-1 que por el contrario aumenta. Todo ello, mediado por la aparición de radicales libres (generadores de un importante estrés oxidativo celular) promoviendo un desbalance de diferentes bioseñales, con el consiguiente aumento de expresión de moléculas de adhesión, tales como la proteína quimiotáctica de monocitos o de moléculas pertenecientes a la familia de las selectinas, etc., que juegan un papel central en los procesos de quimiotaxis, infiltración de distintas poblaciones leucocitarias y presencia de complicaciones trombóticas. Además, se produce una variación en el fenotipo secretorio celular, aumentando la producción de componentes de la lámina basal y de distintos componentes de matriz extracelular tal como lo concluyen un sinnúmero de investigaciones.

3.1.1. Inducción de hiperglucemia mediante la administración en una sola dosis de estreptozotocina (STZ) en ratas, observado 7 días después de injuriado el tejido pancreático

Los valores individuales de glucemia de los diferentes grupos de estudio se muestran en la tabla 4 y figura 4. La tabla muestra que las ratas pertenecientes al

grupo blanco (no tratadas con STZ), mantuvieron la glucemia en el rango de referencia establecido como normal (5,87 - 5,94 mmol/l), mientras que los animales del grupo control, experimental 1 y experimental 2, tratados con dosis única de 60 mg/kg de STZ, el séptimo día posterior a la injuria alcanzaron valores de 26,64; 23,42 y 24,00 mmol/l respectivamente, los cuales están por encima de 17 mmol/l indicando una clara hiperglucemia.

La prueba de Friedman muestra que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores basales, del día 1 versus el día 7 tanto en el grupo control como en los experimentales.

La prueba post hoc de Bonferroni permite demostrar que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores de glucemia basal y los del séptimo día después de la injuria del páncreas, condición que permite realizar la investigación según el protocolo establecido para la experimentación.

Tabla N° 4:

Comparación de los niveles de glucemia basal (mM/l) con los del primer y séptimo día de injuriar con estreptozotocina (STZ) el tejido pancreático de ratas a los grupos control y experimental

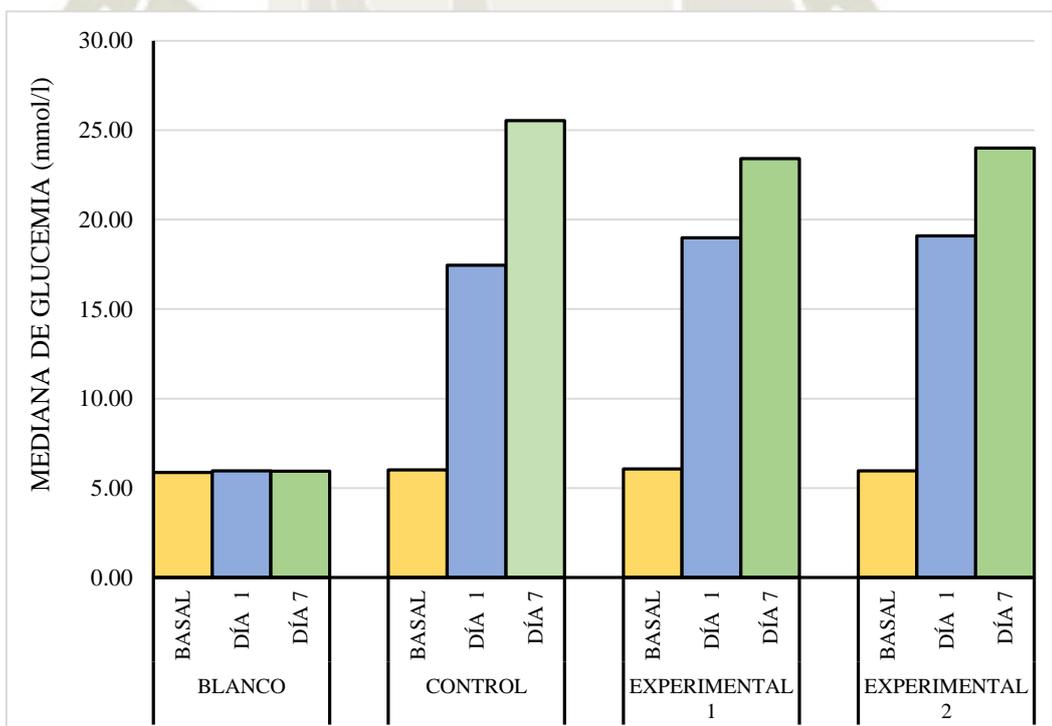
Tiempo (días)	Estadísticos	Niveles de glucemia (mM/l)			
		Blanco	Control	Experimental 1	Experimental 2
	n	5	5	5	5
Basal	Me(R_{intercuartil})	5,87(0,42)	6,02(0,34) ^a	6,06(0,47) ^a	5,95(0,26) ^a
1	Me(R_{intercuartil})	5,95(0,12)	17,17(1,34) ^{a,b}	18,98(3,53) ^{a,b}	19,10(4,34) ^{a,b}
7	Me(R_{intercuartil})	5,94(0,25)	26,64(4,24) ^b	23,42(3,63) ^b	24,00(5,50) ^b
	F	1,60	10,00	10,00	10,00
	P_{valor}	0,449	0,007	0,007	0,007
	Significancia	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

- El grupo blanco recibió placebo en lugar de STZ
- n: tamaño de la muestra
- $Me(R_{intercuartil})$: Mediana(Cuartil 3 – cuartil 1)
- Se calculó el estadístico F de Friedman para más de 02 muestras relacionadas, con un nivel de confianza del 95 %.
- Prueba Post Hoc de Bonferroni. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Figura N° 4

Comparación de los promedios de glucemia basal (mM/l) con los del primer y séptimo día de injuriar con estreptozotocina (STZ) el tejido pancreático de ratas a los grupos control y experimental



3.1.2. Determinación malondialdehído (MDA) sérico como marcador de estrés oxidativo resultado de la inducción de hiperglucemia

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 y figura 5. Se observa que en el grupo blanco no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores basales y los del día 1 y 7 debido a que este grupo no se le administró STZ, en este grupo el séptimo día se obtuvo una mediana de 1,17 $\eta\text{M/ml}$. Por el contrario, en los grupos control y experimentales 1 y 2 se observó diferencia significativa ($p < 0,05$), resultado que nos permite demostrar la presencia de estrés oxidativo, condición que se requiere para realizar los siguientes experimentos. En el grupo control, en el sétimo día, se alcanzó una mediana de 3,57 $\eta\text{M/ml}$ y tanto en el experimental 1 y como en el experimental 2 de 3,80 $\eta\text{M/ml}$.

La prueba post hoc de Bonferroni permite demostrar que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores de malondialdehído basal y los del sétimo día después de la injuria del páncreas, condición que permite realizar la investigación según lo establecido en el protocolo de experimentación.

Tabla N° 5:

Niveles séricos de malondialdehído (MDA) (η M/ml) después de injuriar el tejido pancreático de ratas con estreptozotocina (STZ) a los grupos control y experimental

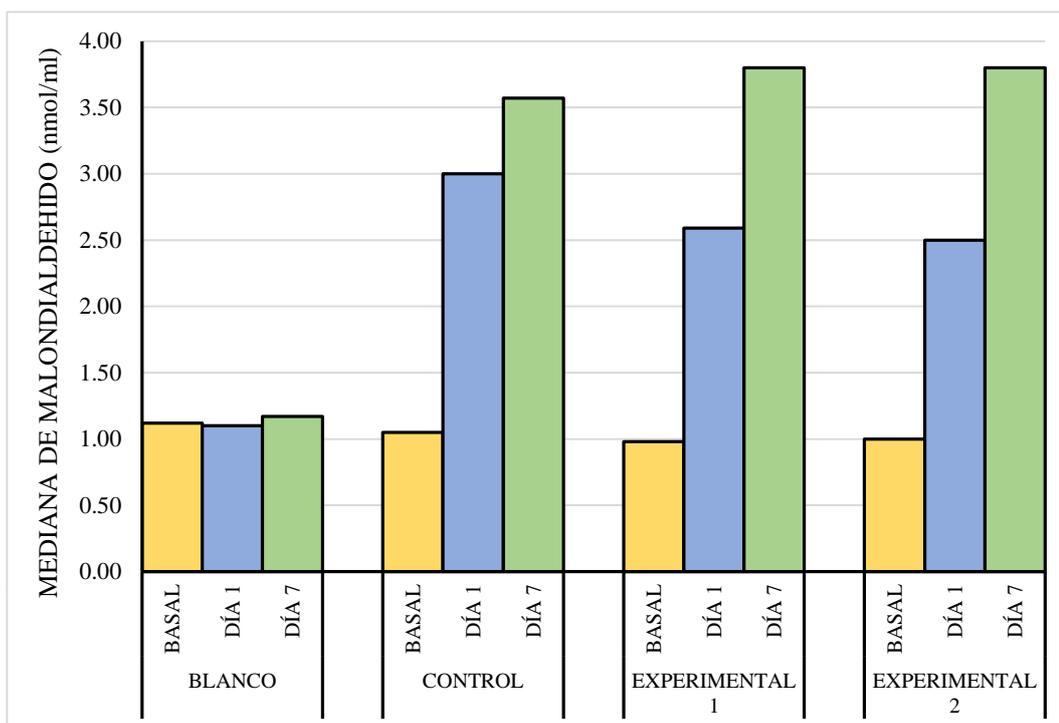
Tiempo (días)	Estadísticos	Niveles séricos de malondialdehído (η M/ml)			
		Blanco	Control	Experimental 1	Experimental 2
	n	5	5	5	5
Basal	Me(R_{intercuartil})	1,12(0,08)	1,05(0,13) ^a	0,98(0,12) ^a	1,00(0,45) ^a
1	Me(R_{intercuartil})	1,10(0,36)	3,00(0,52) ^{a,b}	2,59(0,26) ^{a,b}	2,50(0,45) ^{a,b}
7	Me(R_{intercuartil})	1,17(0,16)	3,57(0,65) ^b	3,80(0,28) ^b	3,80(0,25) ^b
	F	0,105	10,00	10,00	10,00
	P_{valor}	0,949	0,007	0,007	0,007
	Significancia	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

- n: tamaño de la muestra
- Me(R_{intercuartil}): Mediana(Cuartil 3 – cuartil 1)
- Se calculó el estadístico F de Friedman para más de 02 muestras relacionadas, con un nivel de confianza del 95 %
- Prueba Post Hoc de Bonferroni. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Figura N° 5

Promedio de malondialdehído (MDA) (η M/ml) sérico después de injuriar el tejido pancreático de ratas con estreptozotocina (STZ) a los grupos control y experimental



3.1.3. Determinación de los parámetros fisiológicos de vasoconstricción con noradrenalina (NA) y vasodilatación con acetilcolina (ACh) en anillos aislados de aorta torácica de ratas del grupo blanco

Los resultados del grupo blanco se muestran en la tabla 6 y figura 6. Estos resultados son de gran importancia debido a que constituyen el patrón de vasoconstricción en respuesta a las dosis crecientes de NA y de vasodilatación en respuesta a las dosis crecientes de ACh.

Con $10,0 \mu\text{M}$ de NA se alcanzó el máximo valor de vasoconstricción el cual se consideró como 100 % para el inicio del tratamiento con la primera dosis de ACh ($0,01 \mu\text{M}$). A partir de este valor se procedió a medir el porcentaje de vasodilatación para cada uno de los tratamientos.

Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis muestran que en el patrón de vasoconstricción existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para las tres dosis aplicadas de NA. De la misma forma, también existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para las cuatro dosis de ACh que constituyen el patrón de vasodilatación.

Es importante mencionar que después de aplicada la cuarta dosis se realizaron dos mediciones adicionales, observando que se sigue produciendo vasodilatación de los anillos de aorta.

Realizando las comparaciones múltiples de los porcentajes de vasodilatación con la prueba post hoc de Bonferroni se muestra diferencia significativa ($p < 0,05$) con la mayor concentración de ACh utilizada (10,00 μM) midiendo un valor de 23,30%, correspondiendo un 78,07% de vasodilatación.

Tabla N° 6:

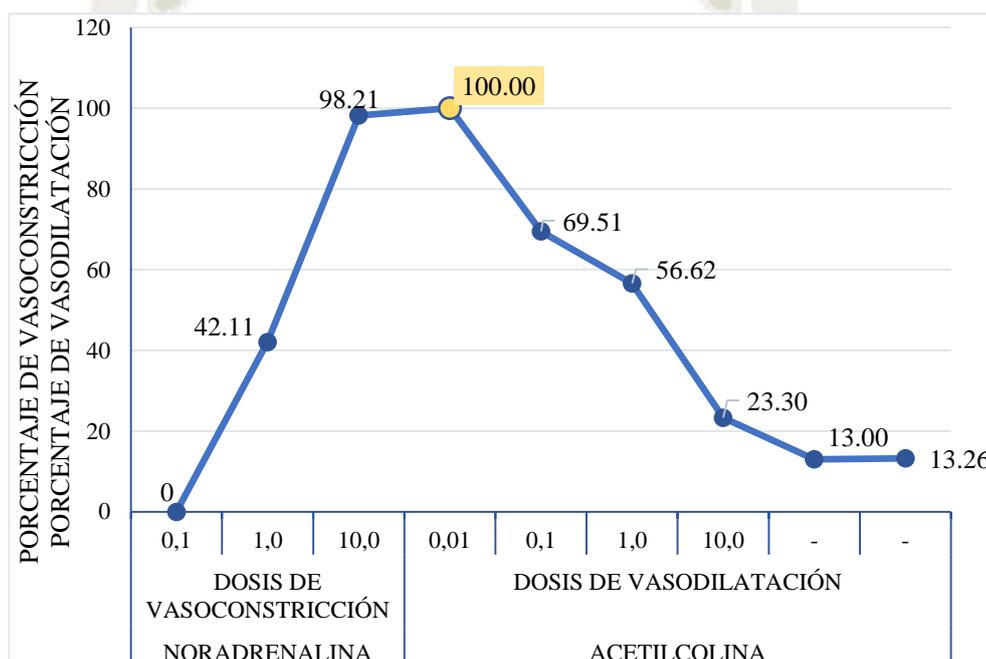
Patrón de vasoconstricción y vasodilatación empleando 3 dosis crecientes de noradrenalina (NA) y 4 dosis crecientes de acetilcolina (ACh) respectivamente en anillos aórticos procedentes de ratas del grupo blanco

GRUPO BLANCO	Noradrenalina (μM)			Acetilcolina (μM)					
	Dosis de vasoconstricción			Dosis de vasodilatación					
	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0	-	-
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Me(R_{intercuartil}) (%)	0 ^a	42,11(2,74) ^{ab}	98,21(2,73) ^b	100,00(0,00) ^a	69,51(4,29) ^{ab}	56,62(2,44) ^{b,c}	23,30(1,95) ^c	13,00(0,71)	13,26(1,40)
H	12,96			27,48					
P_{valor}	0,002			0,000					
Significancia	p < 0,05			p < 0,05					

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

Figura N° 6

Curva dosis-respuesta del patrón de contracción y relajación fisiológico empleando 3 dosis crecientes de noradrenalina (NA) y 4 dosis crecientes de acetilcolina (ACh) respectivamente en anillos aórticos procedentes de ratas del grupo blanco.



3.1.4. Inducción de disfunción endotelial resultado del estrés oxidativo observado a través de la respuesta vasoactiva (vasoconstricción y vasodilatación) de anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas hiperglucémicas del grupo control

El estrés oxidativo induce disfunción endotelial en los anillos aislados de aorta, efecto que se observa en los resultados presentados en la tabla 7 y figura 7, los que corresponden a los obtenidos en el grupo control. Frente a las 04 dosis crecientes de acetilcolina se presenta vasodilatación, existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los porcentajes obtenidos siendo 73,33 el porcentaje que corresponde para la dosis de 10,0 μM de ACh. Así mismo, se midió 73,33% de vasodilatación para la dosis de 10,00 μM de ACh.

Tabla N° 7:

Dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y de 4 dosis crecientes de ACh (μM) sobre anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Control

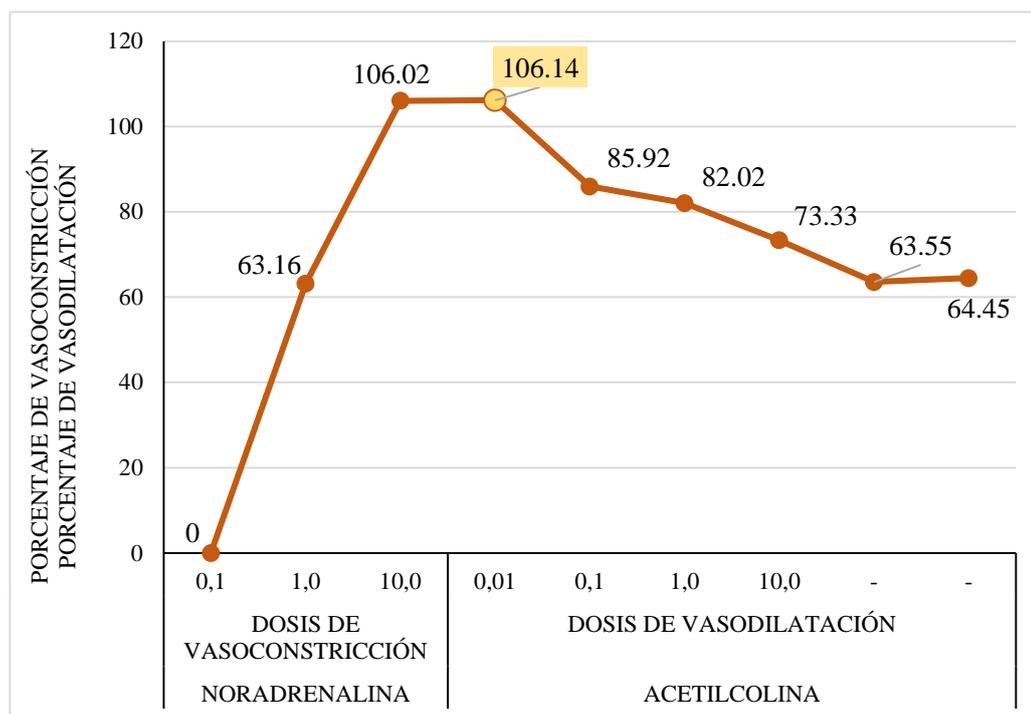
GRUPO CONTROL	Noradrenalina (μM)			Acetilcolina (μM)					
	Dosis de vasoconstricción			Dosis de vasodilatación					
	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0	-	-
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Me(Rintercuartil) (%)	0 ^a	63,16(2,18) ^{a,b}	106,02(8,20) ^b	106,14(5,78) ^a	85,92(2,88) ^{a,b}	82,02(4,60) ^{b,c}	73,33(3,60) ^c	63,55(1,82)	64,45(4,75)
H de Kruskal- Wallis	12,96			27,43					
P_{valor}	0,002			0,000					
Significancia	p < 0,05			p < 0,05					

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

- Los resultados se expresan como porcentaje.
- Los porcentajes representan el promedio de 2 anillos aislados por cada unidad de estudio, como cada grupo estuvo conformado por 5 ratas, en total se trabajó con 10 anillos.
- n: tamaño de la muestra
- Me($R_{intercuartil}$): Mediana(Cuartil 3 – cuartil 1)
- Se calculó el estadígrafo H para más de 02 muestras independientes, con un nivel de confianza del 95 %
- Prueba Post Hoc de Bonferroni de Kruskal-Wallis. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Figura N° 7

Curva dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y de 4 dosis crecientes de ACh (μM) sobre anillos aislados de aorta procedentes del grupo control



3.1.5. Respuesta vasoconstrictora de anillos de aorta con disfunción endotelial previamente incubados con óxido nitroso (N₂O)

3.1.5.1. Efecto frente a 03 dosis crecientes de noradrenalina

En la tabla 8 y figura 8 se observan los valores de vasoconstricción que se alcanzan para cada dosis de NA, siendo 113,88 el medido para 10,0 μM . Se demostró que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para las 03 dosis aplicadas.

De la misma forma, se demostró que la aplicación de 04 dosis crecientes de ACh produce vasodilatación de los anillos existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos. Para 10,0 μM de ACh el porcentaje de vasodilatación fue de 85,89.

Tabla N° 8:

Dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del grupo experimental 1 después de la incubación con óxido nítrico

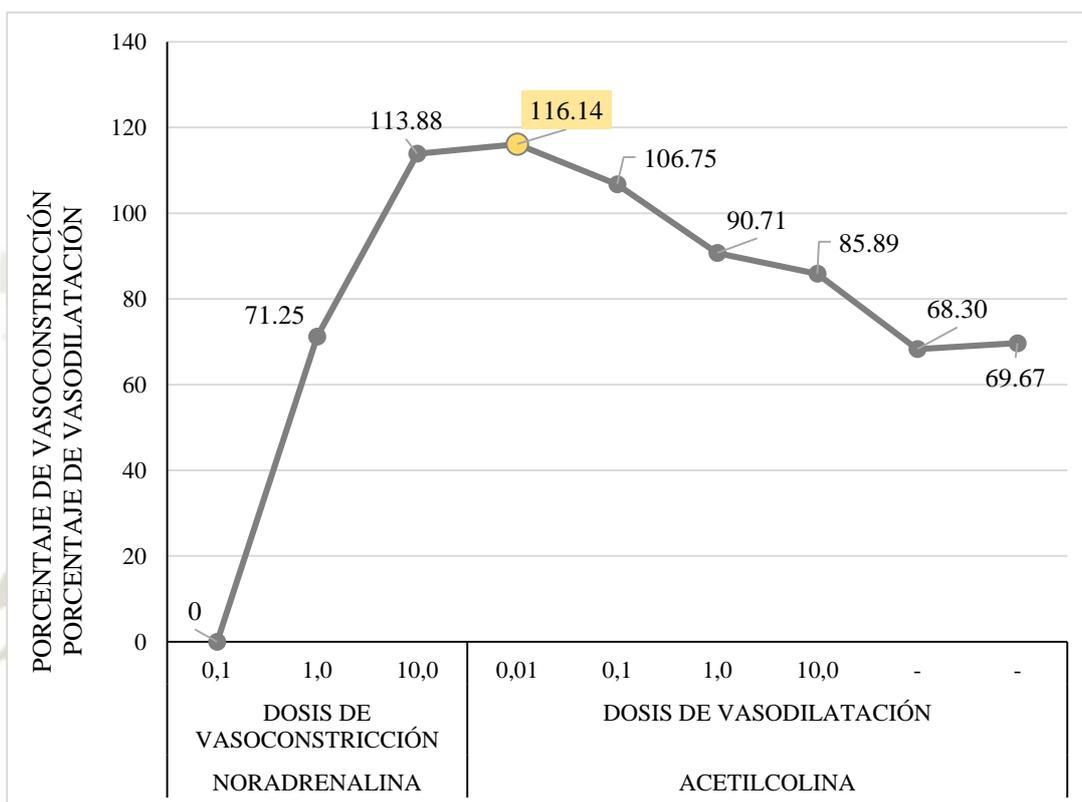
GRUPO EXPERIMENTAL 1	Noradrenalina (μM)			Acetilcolina (μM)					
	Dosis de vasoconstricción			Dosis de vasodilatación					
	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0	-	-
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Me(Rintercuartil) (%)	0 ^a	71,25(3,92) ^{a,b}	113,88(6,09) ^b	116,14(6,75) ^a	106,75(4,39) ^{a,b,c}	90,71(5,32) ^{b,c}	85,89(7,84) ^c	68,30(2,53)	69,67(2,48)
H de Kruskal-Wallis	12,96			27,14					
P_{valor}	0,002			0,000					
Significancia	p < 0,05			p < 0,05					

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

- Los resultados se expresan como porcentaje.
- Los porcentajes representan el promedio de 2 anillos aislados por cada unidad de estudio, como cada grupo estuvo conformado por 5 ratas, en total se trabajó con 10 anillos
- n: tamaño de la muestra
- Me($R_{intercuartil}$): Mediana(Cuartil 3 – cuartil 1)
- Se calculó el estadígrafo H para más de 02 muestras independientes, con un nivel de confianza del 95 %
- Prueba Post Hoc de Bonferroni de Kruskal-Wallis. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Figura N° 8

Curva dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Experimental 1 después de la incubación con óxido nítrico



3.1.5.2. Efecto frente a 03 dosis crecientes de fenilefrina como agonista α -adrenérgico

En la tabla 9 y figura 9 se observan los valores de vasoconstricción que se alcanzan para cada dosis de Fenilefrina, siendo 108,61 el porcentaje medido para 10,0 μM . Se demostró que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para las 03 dosis aplicadas.

Así mismo, se demostró que la aplicación de 04 dosis crecientes de ACh produce vasodilatación de los anillos existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos. Para 10,0 μM de ACh el porcentaje de vasodilatación fue de 82,60.

Tabla N° 9:

Dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Experimental 2 después de la incubación con óxido nitroso

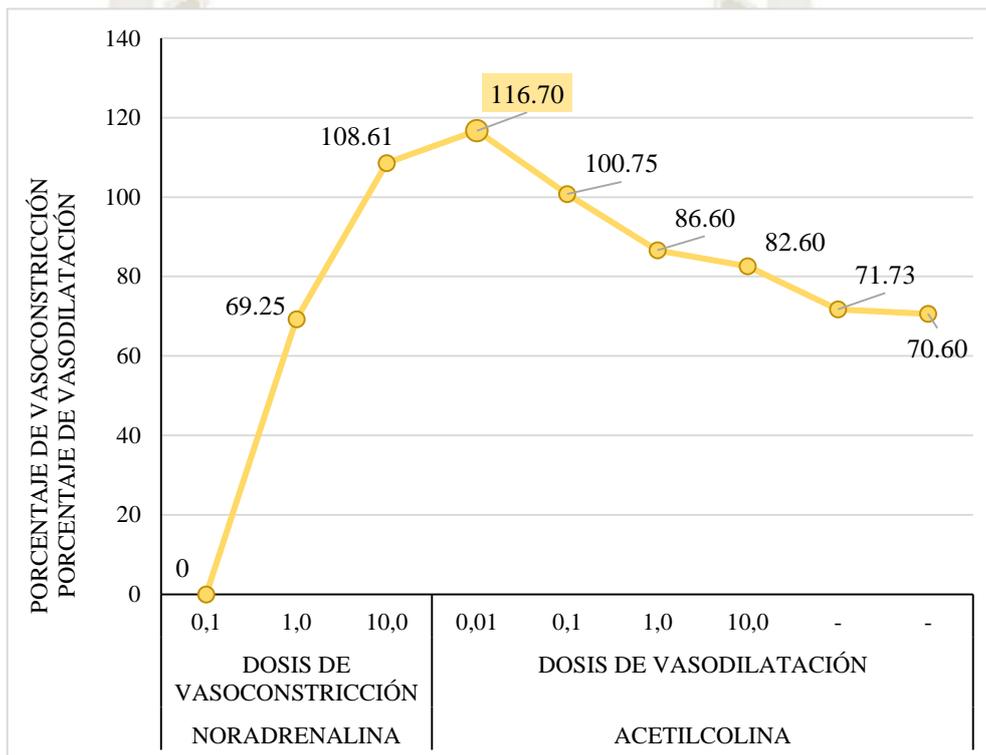
GRUPO EXPERIMENTAL 2	Fenilefrina (μM)			Acetilcolina (μM)					
	Dosis de vasoconstricción			Dosis de vasodilatación					
	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0	-	-
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Me(Rintercuartil) (%)	0 ^a	69,25(5,06) ^{a,b}	108,61(5,18) ^b	116,70(3,80) ^a	100.75(4,77) ^{a,b,c}	86,60(3,99) ^{b,c}	82,60(1,83) ^c	71,73(1,06)	70,60(1,56)
H de Kruskal- Wallis	12,96			27,36					
P_{valor}	0,002			0,000					
Significancia	p < 0,05			p < 0,05					

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

- Los resultados se expresan como porcentaje.
- Los porcentajes representan el promedio de 2 anillos aislados por cada unidad de estudio, como cada grupo estuvo conformado por 5 ratas, en total se trabajó con 10 anillos.
- n: tamaño de la muestra
- Me($R_{intercuartil}$): Mediana(Cuartil 3 – cuartil 1)
- Se calculó el estadígrafo H para más de 02 muestras independientes, con un nivel de confianza del 95 %.
- Prueba Post Hoc de Bonferroni de Kruskal-Wallis. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Figura N° 9

Curva dosis-respuesta en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en respuesta a 3 dosis crecientes de FE de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM) en anillos aislados de aorta procedentes del Grupo Experimental 2 después de la incubación con óxido nítrico.



3.1.6. Comparación de la respuesta vasoactiva de los grupos estudiados

En la tabla 10 y figura 10 se presentan los resultados obtenidos para los 04 grupos de estudio. Con respecto a la respuesta vasoconstrictora del músculo liso de los anillos de aorta se observa que los porcentajes son mayores en los grupos experimental 1 y experimental 2, siendo 113,88% y 108,61%, respectivamente. La prueba de Kruskal-Wallis establece que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los porcentajes medidos en los cuatro grupos de estudio.

Para el caso de la vasodilatación, se observa la respuesta para la aplicación de 04 dosis crecientes de ACh, siendo menor el porcentaje de vasodilatación en los

grupos experimentales 1 y 2. En estos casos también se observa diferencia significativa ($p < 0,05$) al comparar los cuatro grupos de estudio para cada dosis.

En los grupos experimentales 1 y 2, para la dosis de $10,0 \mu\text{M}$ de ACh, se obtuvieron porcentajes de vasodilatación de 85,89 y 82,60, respectivamente, valores que según la prueba post hoc de Bonferroni no presentan diferencia significativa ($p > 0,05$).

Es importante mencionar que el patrón de vasoconstricción y vasodilatación obtenido para el grupo blanco se ve significativamente modificado en la disfunción endotelial producida por estrés oxidativo, respuesta que aún se ve más alterada con la aplicación de óxido nítrico, sustancia con la que se observa mayor vasoconstricción y menor vasodilatación en comparación con el grupo blanco y control, presentando diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla N° 10:

Comparación de la dosis-respuesta de los cuatro grupos de estudio (Blanco, Control y Experimental 1 y 2) en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo a los grupos control y experimental en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM).

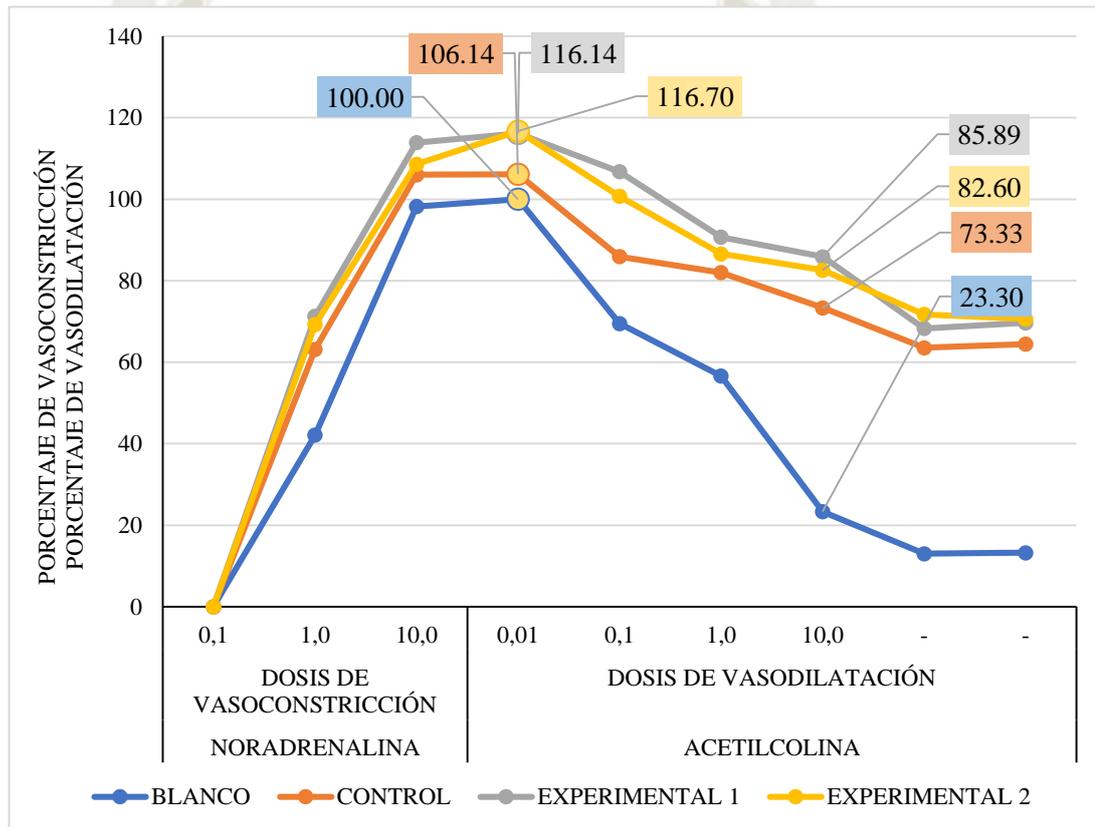
GRUPO	DOSIS								
	Noradrenalina/Fenilefrina (μM)			Acetilcolina (μM)					
	Dosis de vasoconstricción			Dosis de vasodilatación					
	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0	-	-
Blanco Me($R_{\text{intercuartil}}$)	0	42,11(2,74) ^a	98,21(2,73) ^a	100,00(0,00) ^a	69,51(4,29) ^a	56,62(2,44) ^a	23,30(1,95) ^a	13,00(0,71) ^a	13,26(1,40) ^a
Control Me($R_{\text{intercuartil}}$)	0	63,16(2,18) ^b	106,02(8,20) ^b	106,14(5,78) ^b	85,92(2,88) ^b	82,02(4,60) ^b	73,33(3,60) ^b	63,55(1,82) ^b	64,45(4,75) ^b
EXPERIMENTAL 1 Me($R_{\text{intercuartil}}$)	0	71,25(3,92) ^c	113,88(6,09) ^c	116,14(6,75) ^{c,d}	106,75(4,39) ^c	90,71(5,32) ^c	85,89(7,84) ^{c,d}	68,30(2,53) ^{b,c}	69,67(2,48) ^{b,c}
EXPERIMENTAL 2 Me($R_{\text{intercuartil}}$)	0	69,25(5,06) ^{b,c}	108,61(5,18) ^{b,c}	116,70(3,80) ^d	100,75(4,77) ^{b,c}	86,60(3,99) ^{b,c}	82,60(1,83) ^d	71,73(1,06) ^c	70,60(1,56) ^c
H de Kruskal-Wallis	0	10,14	8,34	9,42	11,58	10,58	9,50	12,50	10,50
P_{valor}	0	0,006	0,015	0,009	0,003	0,005	0,009	0,002	0,005
Significancia	-	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

Fuente: Medidas de resumen obtenidas de la experimentación realizada en el CIDEC-UNSA

- Los resultados se expresan como porcentaje.
- Los porcentajes representan el promedio de 2 anillos aislados por cada unidad de estudio, como cada grupo estuvo conformado por 5 ratas, en total se trabajó con 10 anillos.
- $Me(R_{intercuartil})$: Mediana(Cuartil 3 – cuartil 1)
- Se calculó el estadígrafo H para más de 02 muestras independientes, con un nivel de confianza del 95 %.
- Prueba Post Hoc de Bonferroni de Kruskal-Wallis. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

Figura N° 10

Comparación de la curva dosis-respuesta de los cuatro grupos de estudio (Blanco, Control y Experimental 1 y 2) en disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo a los grupos control y experimental en respuesta a 3 dosis crecientes de NA (μM) y a 4 dosis crecientes de ACh (μM).



3.2. Discusión

Sir A. Garrod descubrió en 1902 que la alcaptonuria se producía debido a un desorden metabólico que era heredado en forma mendeliana simple, diversas patologías humanas han sido reconocidas como el resultado de un defecto en la constitución genética de los individuos afectados. Paralelamente al desarrollo del conocimiento respecto a la patología humana, se detectaron, o desarrollaron, modelos animales de otras enfermedades en los humanos. Estos modelos dan un soporte importante para la comprensión de la patogénesis de gran número de enfermedades y son de gran ayuda en el desarrollo de terapias que puedan sustituir la función defectiva de un gen específico (48).

En relación a la medicina experimental, se está de acuerdo con Benavides y Guenet (48) que los roedores constituyen un organismo modelo que ofrece muchas ventajas en comparación con otros modelos genéticos como, por ejemplo, la mosca *Drosophila melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* (considerando que ambos organismos tienen sus genomas secuenciados en forma completa).

Desde inicios del siglo pasado hasta la fecha, los modelos murinos han aportado notablemente a la comprensión de la patogénesis de buen número de enfermedades y en el desarrollo de nuevas terapias.

Asimismo, los murinos son una subfamilia de roedores miomorfos que pertenecen a la familia muridae que incluye a los usualmente llamados ratones y ratas, por lo menos unas 519 especies. Esta sub familia se encuentra en mayor cantidad que todas las familias de mamíferos (48).

En la actualidad, la tendencia de las investigaciones biomédicas muestra una visión de que, en el futuro próximo, se acrecentará la disponibilidad de modelos murinos debido a la gran cantidad de técnicas de manipulación genética y proyectos de mutagénesis química que son utilizados. Se está viviendo en la denominada era *post-genómica* y será trascendental apoyarse con estos modelos animales para un adecuado

estudio funcional de las secuencias obtenidas de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino.

El compendio de mutaciones del ratón, que ha sido recopilado en las décadas pasadas por los genetistas y bioteristas, se constituye como valiosa fuente de modelos animales para la realización de estudios de los desórdenes genéticos humanos homólogos. Un número regular de esas mutaciones son conocidas en términos moleculares, por lo tanto, se utilizan en el desarrollo y evaluación de terapias innovadoras para el uso humano. En este aspecto, se puede afirmar que la genética del ratón, y con ella la genética de los mamíferos, está experimentando una real revolución (48).

Como el presente trabajo estuvo abocado a demostrar que el efecto anestésico del óxido nítrico exacerbaba la respuesta adrenérgica en paciente con disfunción endotelial fue indispensable producir dicha disfunción endotelial en los animales de experimentación. Es por ello, que se recurrió al método murino para inducir hiperglucemia y con ello gracias a la oxidación que promueve, provocar disfunción endotelial en sus vasos sanguíneos y en especial en la aorta con la cual se trabajó en el presente estudio. La administración de estreptozotocina en una sola dosis, destruyó las células beta del páncreas impidiendo la síntesis de insulina necesaria para el metabolismo de la glucosa en células musculares y en adipocitos. Tal resultado se presentó en la tabla 4 y su respectiva figura, donde transcurridos 7 días de la administración de estreptozotocina, el incremento de la glucemia fue significativo. Y como una consecuencia directa de ello, el daño a las células endoteliales promoviendo en ellas una sobreproducción de radicales libres (oxidación) lo cual se comprobó determinando en sangre, el marcador oxidativo malondialdehído tal como lo confirma la tabla y figura 5.

Hoy día se sabe que el desbalance del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ERO) conducen al estrés oxidativo que es una condición para las enfermedades cardiovasculares. También se sabe que la presencia de EROs, tiene un efecto directo sobre las células musculares lisas y fibroblastos que influyen en la

respuesta vaso reactiva. Para demostrar este efecto, se comparó su vasoactividad con las respuestas obtenidas con vasos sanguíneos normales (sin hiperglucemia). Por lo cual, trabajando con anillos aislados procedentes del grupo control, se obtuvieron los parámetros como la máxima contracción con la mayor dosis de norepinefrina (considerándola como del 100%) y a continuación la respuesta vasodilatadora con la mayor dosis de acetilcolina (10 μ M). Ambos parámetros dada su normalidad sirvieron como patrones para comparar con los porcentajes obtenidos con el resto de animales todos ellos con disfunción endotelial. Así, la tabla 6 con su respectiva figura muestra que existe una máxima contracción promovida por la noradrenalina y que esta puede ser revertida estimulando receptores muscarínicos (M3) de la acetilcolina y alcanzarse una relajación semejante al 87% que se asume es su mayor relajación para el caso de la aorta, cuando las células endoteliales están normales. La representación relajante se muestra igualmente en la figura y tabla 6.

Los resultados obtenidos con anillos aórticos procedentes de ratas normales de 12 semanas tuvieron similar comportamiento con los animales de la misma edad estudiados por Pasos et al. (49), tanto en respuesta vasoconstrictora con noradrenalina como la vasodilatadora con acetilcolina; con la salvedad que ellos obtuvieron una mayor contracción a menor dosis de noradrenalina debido a que a diferencia del presente estudio, emplearon anillos aislados de mayor longitud que 4mm empleados por el presente trabajo, comparativamente con los empleados por Pasos et al. (49).

La condición de disfunción endotelial indispensable para demostrar la hipótesis se presenta en la figura y tabla 7 donde producto del estrés inducido en los vasos sanguíneos resultado de la hiperglucemia se observa cómo la respuesta contráctil a la NA se ve incrementada llegando a 106.14% siendo lo más resaltante, el deterioro de la relajación frente a la máxima concentración de ACh que para el caso solo llego al 36.45%. Se observa un deterioro de alrededor del 50.29% (86.74 – 36.45) en la relajación del musculo liso vascular, lo cual es respuesta directa del estrés oxidativo presente en los anillos aórticos (39).

Esta condición fisiológica denominada disfunción endotelial puede magnificarse especialmente en la fase de contracción del músculo liso vascular, cuando se administra para uso quirúrgico óxido nitroso como anestésico especialmente, en las intervenciones odontológicas como periodoncia y endodoncia. Esta hipótesis que se postula en el presente estudio constituye el principal aporte del trabajo, pues demuestra cómo la exposición previa y continua de los anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas con disfunción endotelial, incrementan su respuesta contráctil a la noradrenalina de manera altamente significativa. La figura 8 con su respectiva tabla muestran un incremento del orden del 10% (116.14 - 106.14) en la respuesta frente a la misma concentración de NA. Esta respuesta significativa que se presenta en la tabla 8 significa en la práctica clínica, que pacientes por ejemplo hipertensos que permanentemente están variando su concentración plasmática de noradrenalina como neurotransmisor endógeno en respuesta a situaciones de estrés, podrían desencadenar crisis hipertensivas si el procedimiento estomatológico les es injurioso (estresante) y están siendo anestesiados con óxido nitroso.

Finalmente, era necesario saber si este incremento de la contracción muscular traducido en una vasoconstricción que puede llegar a incrementar la presión arterial con especial cuidado en los hipertensos que presentan como parte del cuadro disfunción endotelial, se debía solo a sustancias adrenérgicas endógenas, se expuso los anillos aislados al efecto de un simpático mimético exógeno como lo es la fenilefrina que actúa sobre receptores α -adrenérgicos. La tabla 9 con su respectiva figura demuestra un similar comportamiento en la respuesta vasorreactiva contráctil a la NA que a la FE.

El efecto vasoconstrictor puede ser abolido empleando por ejemplo maíz morado. Así, Moreno y Paz (39) y Lara (19) trabajando con el maíz morado, observaron que su extracto hidroalcohólico era capaz de inhibir el efecto vasoconstrictor al contrario de nuestros resultados que demostraron su incremento en presencia de óxido nitroso solo que en el presente trabajo el efecto es directo potenciando a la noradrenalina y en el caso de ellos fue por un incremento en la producción de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos demostrarían que el óxido nítrico, además de su efecto anestésico, podría estimular a los receptores α -adrenérgicos para incrementar la vasoconstricción o también podría incrementar el estado de oxidación lo que desencadenaría en una mayor disfunción endotelial. Por tanto, es recomendable tomar en cuenta estos resultados cuando se presenten pacientes con enfermedades mórbidas especialmente hipertensión y tengan que realizarse procedimientos odontológicos, por ejemplo.



CONCLUSIONES

PRIMERA: La administración intraperitoneal en una sola dosis en el modelo murino, incrementó de manera altamente significativa los niveles de glucosa plasmática induciéndose diabetes mellitus tipo 1 por la ausencia de insulina.

SEGUNDA: Resultado de la hiperglucemia experimental inducida con estreptozotocina, los animales de manera simultánea mostraron un incremento significativo en su estado de oxidación, demostrado por los altos niveles en suero del marcador oxidativo malondialdehído.

TERCERA: La respuesta vasoactiva de los animales blanco (sin inducción de diabetes), permitieron determinar los patrones de contracción y relajación fisiológicos que sirvieron de patrón de comparación.

CUARTA: La disfunción endotelial inducida por la presencia de estrés oxidativo debido a la inducción experimental de diabetes mellitus, se puso de manifiesto por el incremento de la vasocontracción, así como por la reducción altamente significativa de la respuesta vasodilatadora de los anillos aórticos aislados por efecto de la administración de noradrenalina y acetilcolina respectivamente al baño de órganos.

QUINTA: La respuesta vasoconstrictora de los anillos aórticos aislados disfuncionantes en presencia (en el baño de órganos) de óxido nítrico incrementó aún más y de manera significativa la respuesta contráctil del tejido vascular a la administración de noradrenalina. Respuesta similar se obtuvo cuando se reemplazó al sustrato adrenérgico noradrenalina por un simpático mimético exógeno como la fenilefrina. De esta manera, la hipótesis fue comprobada.

De este modo, se logró abordar todos los objetivos propuestos en la presente investigación.

RECOMENDACIONES

PRIMERA: Considerando que cada vez se está incrementando el empleo del óxido nitroso en las intervenciones estomatológicas, difundir los resultados cuando se enfrentan a un paciente con estrés oxidativo debido a enfermedades mórbidas como por ejemplo, hipertensión, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), diabetes, etc. pues todas ellas cursan con disfunción endotelial.

SEGUNDA: Profundizar en el conocimiento del efecto del óxido nitroso en pacientes que padezcan disfunción endotelial (hipertensos, diabéticos, etc.) mediante la realización de estudios con seres humanos con células endoteliales del cordón umbilical, considerando el estudio de la dosis.

TERCERA: Con la finalidad de complementar la recomendación anterior dada su importancia, consideramos que nuestros resultados deberán ser extrapolados a seres humanos por lo que se sugiere empleando un modelo con cultivos primarios de células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano incubadas en óxido nitroso, observar su respuesta a estímulos adrenérgicos y comprobar si también manifiestan disfunción endotelial por la menor síntesis de óxido nítrico lo que conduciría al deterioro de la vasodilatación y por el contrario, incremento de la vasoconstricción, observado en el presente trabajo.

CUARTA: Difundir los resultados para el conocimiento de los especialistas en especial los odontólogos y los anestesiólogos para que lo tomen en cuenta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guimaraes, S. y Moura, D. Vascular Adrenoceptors: An Update Institute of Pharmacology and Therapeutics. *Pharmacological Reviews*. 2001; 53 (2):319-356.
2. Lameson, J., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Longo, D. y Loscalzo, J. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 18a. México: McGraw-Hill Interamericana, 2012.
3. Gilman y Goodman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12a. México, Bogotá, Buenos Aires: Interamericana, 2014.
4. Smyth, E. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol*, 2010; 5(2): 209–219.
5. Katzung, B. *Farmacología básica y clínica*. 11a. McGraw-Hill; 2013.
6. Brozovich, F., Nicholson, C., Degen, C., Gao, Y., Aggarwal, M., y Morgan, K. Mechanisms of Vasculat Smooth Muscle Contraction and the Basis of Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacology Rewiew*. 2016, 68 (2): 476-532.
7. Tamargo, J. Nuevos bloqueadores de los canales de calcio en el tratamiento de la hipertensión arterial. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2017, 34:5-8.
8. Wang, S., Paek, D, Kim, R., y Cha, B. Variation of systolic blood pressure in rats exposed to cadmium and nickel. *Environ Res*. 2000; 88:116–119.
9. Arboleda-Gómez, D., Aristizábal-Nieto, J., y Hernández-Valdivieso, A. Modelado del sistema cardiovascular para evaluación de técnicas de estimación de reactividad vascular basadas en hiperemia reactiva. *Universidad y Salud*. 2018; 20(2): 139-148.
10. El-Karib, A., Dallak, M., Abd-Ellatif, M., Eid, R., Haidara, M., y Al-Ani, B. La Prediabetes Induce Alteraciones Ultraestructurales en la Aorta de los Grandes Vasos Sanguíneos en Ratas. *International Journal of Morphology*. 2019; 37(2): 647- 653.
11. Mendoza-Vázquez, G., Espinoza-Gómez, F., Guzmán-Silahua, S., y Nava-Zavala, A. Prehipertensión arterial y su relación con factores de riesgo cardiovascular. *El Residente*. 2017; 12(2): 48-57.
12. Gelpi, R. y Buchholz, B. *Neurocardiología: Aspectos fisiopatológicos e implicaciones clínicas*. Elsevier Health Sciences, 2018.

13. Ferreira, N. y Resstel, L. Envolvimento do hipocampo dorsal na modulação da atividade barorreflexa cardíaca: participação dos receptores NMDA, CB1, TRPV1, muscarínicos e do óxido nítrico. 2015.
14. Rodrigues, L., Soares, C., Venuto, D., Santana, R., Xavier, A., da Silva Jr, C., y de Araujo, E. Muscarinic receptors and chronic obstructive pulmonary disease: from biology to clinical practice/Receptores muscarínicos na doença pulmonar obstrutiva crônica: o que é importante saber da biologia a prática clínica? Revista de Medicina. 2016; 95(3): 128-133.
15. Korczynska, M., Clark, M., Valant, C., Xu, J., Von Moo, E., Albold, y Lyda, B. Structure-based discovery of selective positive allosteric modulators of antagonists for the M2 muscarinic acetylcholine receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 2018; 115(10): E2419-E2428.
16. Mian, S., Huff, A., Reed, M., Iceman, K., y Pitts, T. Effect of blocking muscarinic receptors using atropine on thyroarytenoid muscle recruitment during swallow and breathing. The FASEB Journal. 2019; 33(1_supplement): 547-511
17. López-Álvarez, J., Sevilla, M. A., Ortiz, L., Blázquez, M., Soler, M., y Martínez-Martín, P. Efecto de los fármacos anticolinérgicos en el rendimiento cognitivo de las personas mayores. Revista de Psiquiatría y Salud Mental. 2015; 8(1): 35-43.
18. Furchgott, R. y Zawadzki, J. The Obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 288: 373-376
19. Lara, J. Estrés oxidativo, disfunción endotelial y aterosclerosis. Anales de la Facultad de Medicina. 2014; 75(4):351-352.
20. Kawabe, J., Uchikubi, F. y Hasebe, N. (2010). Prostacyclin in vascular diseases. Recent insight and future perspectives. Circ J. 2010; 74(5):836-843
21. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. y Nishiyama, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev. 2007; 59(3):251-287.
22. Paravicini, T. y Touyz, R. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care 31 Suppl. 2008; 2: S170-S180.

23. Molina-Moya, E., Terrón-Camero, L., Pescador-Azofra, L., Sandalio, L., y Romero-Puertas, M. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Production, Regulation and Function During Defense Response. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*. 2019: 573-590.
24. Poulos, T. y Li, H. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design. *Nitric Oxide*. 2017; 63: 68-77.
25. Zalba, G., Beaumont, F., San José, G., Fortuño, A., Fortuño, M. y Díez, J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16 (Suppl 1):2-5.
26. Schildknecht, S. y Ullrich, V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 84(2):183-189.
27. Rodrigo, R. y Rivera, G. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (Monografía). Laboratorio de 64, 2003.
28. Lasségue, B. y Griendling, K. Reactive oxygen species in hypertension. *Am. J. Hypertens*. 2004; 17:852-860.
29. Tresguerres, J. *Fisiología Humana*. 3a: McGraw-Hill Interamericana, 2005.
30. Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica.
31. Yoneyama, H., Yamamoto, A. y Kosaka, H. Neuronal nitric oxide synthase generates superoxide from the oxygenase domain. *Biochem J*. 2001; 360(Pt 1):247-253.
32. Li, H. y Förstermann, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 2000; 190(3):244-254.
33. ESSALUD. Boletín Tecnológico Evaluación de Tecnologías en Salud N°38: Uso del Óxido Nitroso en el Quirófano. 2011.
34. Limbird LE. The receptor concept: a continuing evolution. *Mol Interv*. 2004; 4(6):326-336.
35. Woodcock, E. The roles of α 1A- and α 1B-adrenergic receptors in heart: insights from studies of genetically modified mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(9):884-888.

36. Tautermann CS. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24(17):4073-4079.
37. Hai-Yan, H., Henderson, A., Du, Y., Ryan, K. Two-Enzyme Pathway Links L-Arginine to Nitric Oxide in N-Nitroso Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 2019; 141(9):4026-4033.
38. Pirahanchi, Y., Marsidi, J. y Brown, K. *Physiology, Endothelial Derived Relaxation Factor*. StatPearls Publishing, 2019.
39. Moreno, O. y Paz, A. Efecto vasodilatador mediado por óxido nítrico del extracto hidroalcohólico de *Zea mays L.* (maíz morado) en anillos aórticos de rata. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010; 27(4):527-531.
40. Marchio, P. *Efecto del entrenamiento físico sobre los factores endoteliales en el sistema arterial de conejo*. Valencia: Universitat de Valencia, 2015.
41. Del Castillo, N. *Incremento de la relajación no dependiente del endotelio por efecto del estradiol sobre la actividad del ion calcio en anillos aórticos de rata con disfunción endotelial*: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, 2021.
42. Kobayashi, J.; Uchida, H.; Kofuji, A.; Ito, J.; Shimizu, M.; Kim, H.; Sekiguchi, Y.; Kushibe, S. Molecular regulation of skeletal muscle mass and the contribution of nitric oxide: A review. *FASEB Bioadv*. 2019; 1(1):364–374.
43. Kang, K. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol. Res*. 2014; 30(3):141-148.
44. Ogoshi, T., Tsutsui, M., Kido, T., Sakanashi, M., Naito, K., Oda, K., Ishimoto, H., Yamada, S., Wang, K., Toyohira, Y., Izumi, H., Masuzaki, H., Shimokawa, H., Yanagihara, N., Yatera, K. y Mukae, H. Protective Role of Myelocytic Nitric Oxide Synthases against Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018; 198(2):232-244.
45. Zgheel, F., Perrier, S., Remila, L., Houngue, U., Mazzucotelli, J., Morel, O., Auger, C. y Schini-Kerth, V. EPA: DHA 6:1 is a superior omega-3 PUFAs formulation attenuating platelets-induced contractile responses in porcine coronary and human internal mammary artery by targeting the serotonin pathway via an increased endothelial formation of nitric oxide. *European Journal of Pharmacology*. 2019; 853:41-48.

46. Da Silva, R., Alexandre, Á., Reia, T., Lacchini, R., Oliveira, G., Pinheiro, L., Tanus-S., José; Jacomini, A., Bueno, C. y Saranz, A. Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and physical fitness levels with plasma nitrite concentrations and arterial blood pressure values in older adults. PLoS ONE. 2018; 13(10):1-11.
47. García, A., Fuentes, R., Torres, M., Fernández, M. y Charróo, O. Óxido Nítrico Un nitrovasodilatador endógeno. Facultad de Ciencias Médicas Guantánamo, 2003.
48. Benavides, F., Guenet, Jean-Louis. Modelos murinos de enfermedades humanas. Medicina. 2001; 61(2):215-231.
49. Pasos, J., Miranda, A., Totsuka, S., Hernández, J., Pascoe, S., Garibay, C., Cardona, E. Envejecimiento, reactividad vascular adrenérgica y síntesis de óxido nítrico en anillos de aorta de rata. Revista Mexicana de Cardiología. 2007; 18(4):173-180.
50. Ramos, H. y Domingo, J. Diabetes mellitus experimental. Ciencia Veterinaria. 1994; 6(1): 347-377.
51. Wiener Lab. Glicemia enzimática AA-Línea líquida. 2000.
52. Ohkawa, H.; Ohishi, N. y Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry. 1979; 95: 351-358.



ANEXOS

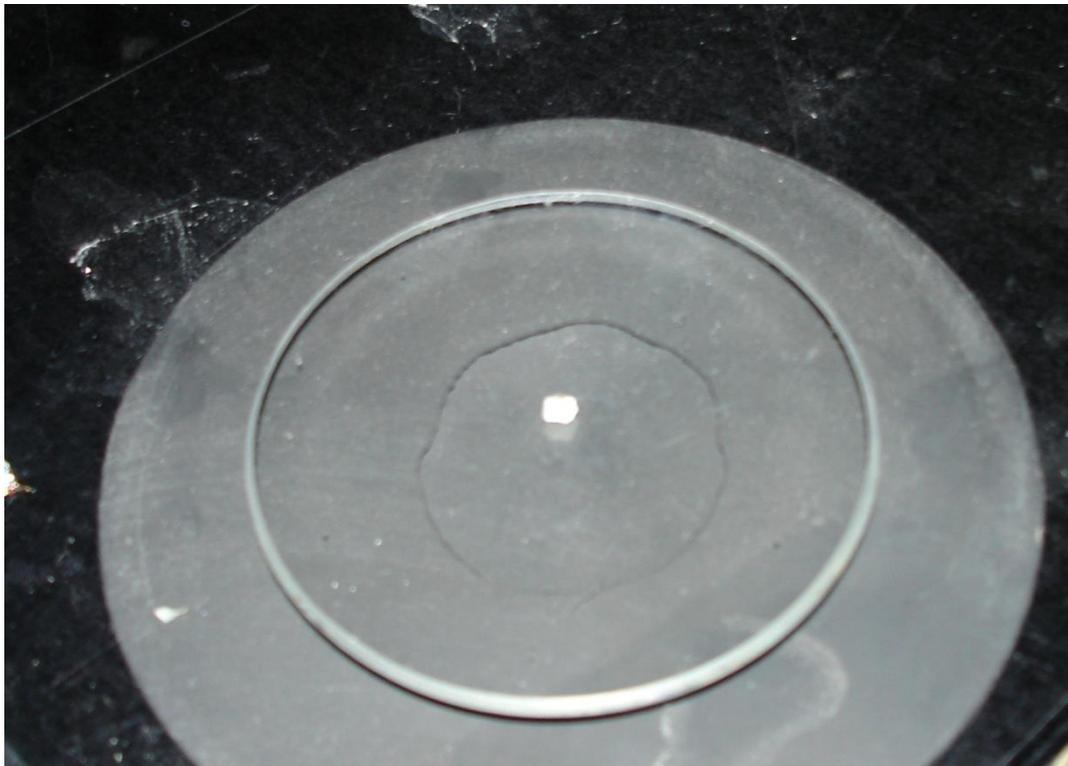
Anexo 1. Obtención de la aorta torácica



Anexo 2. Corte de aorta torácica



Anexo 3. Anillo de la aorta torácica



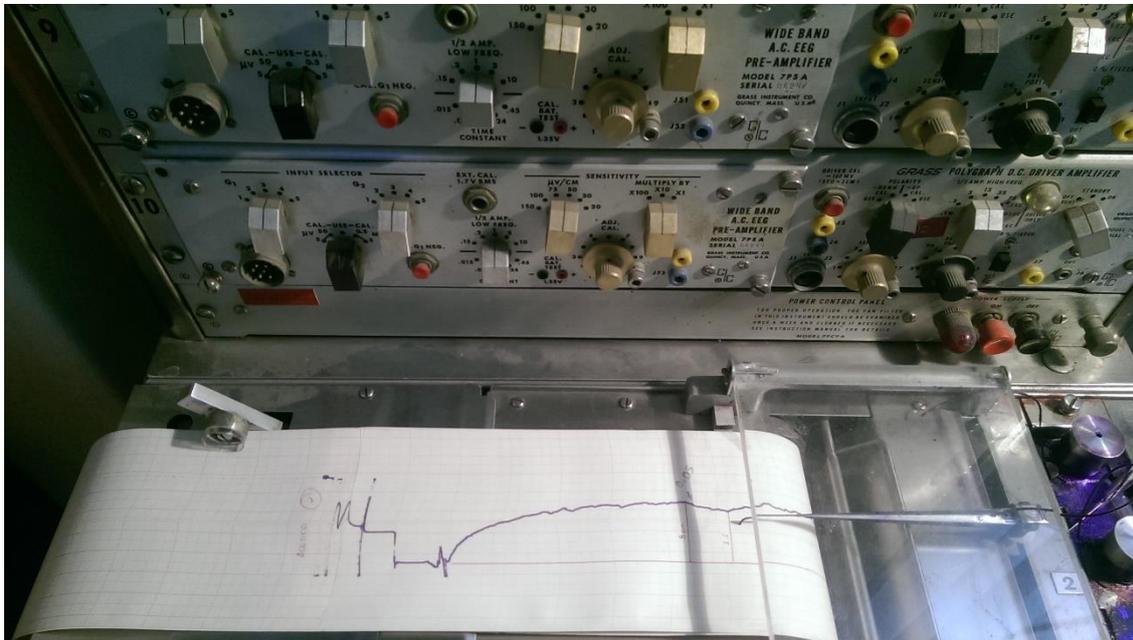
Anexo 4. Polígrafo y cámara de órganos aislados

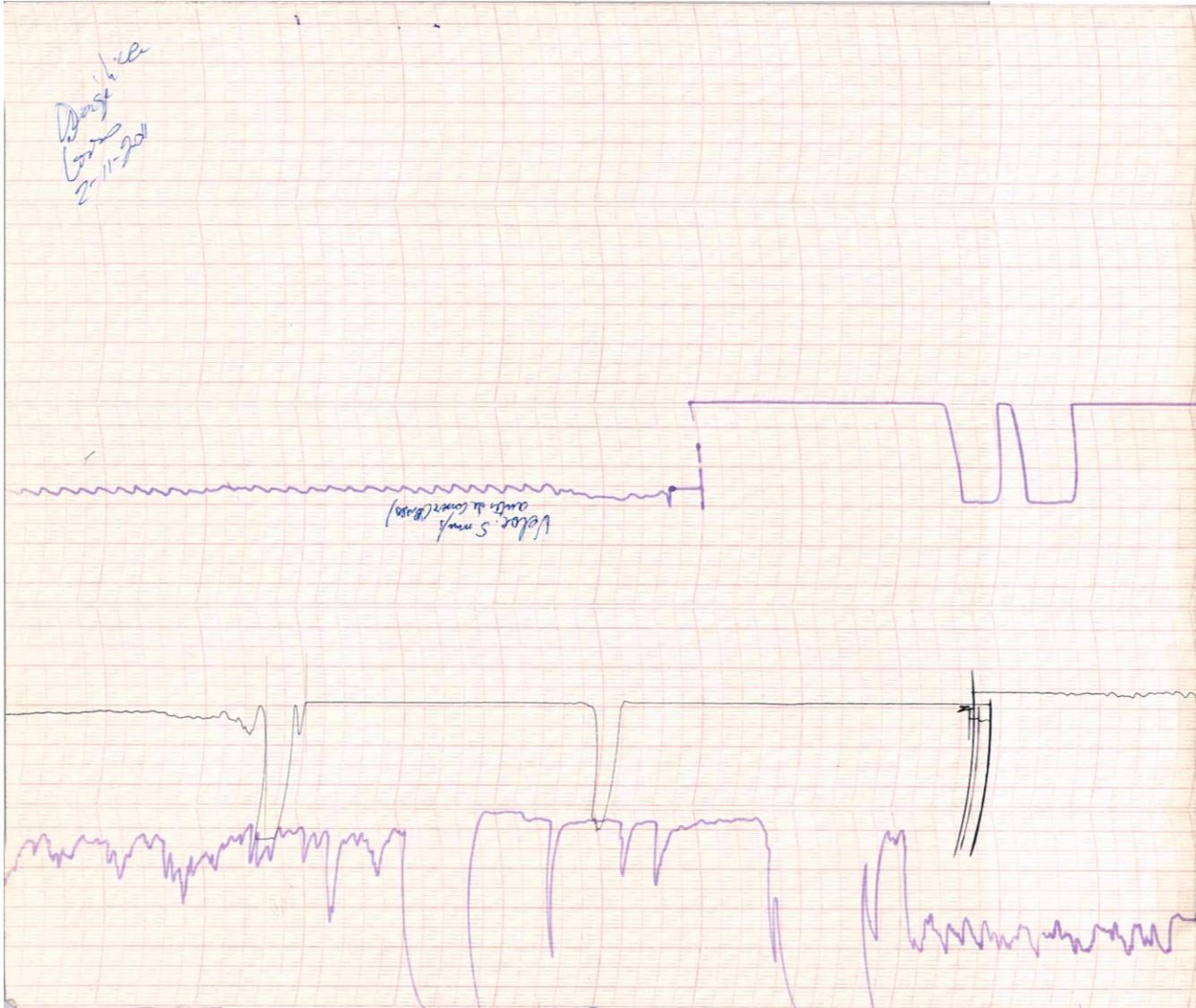


Anexo 5. Cámara de órganos aislados

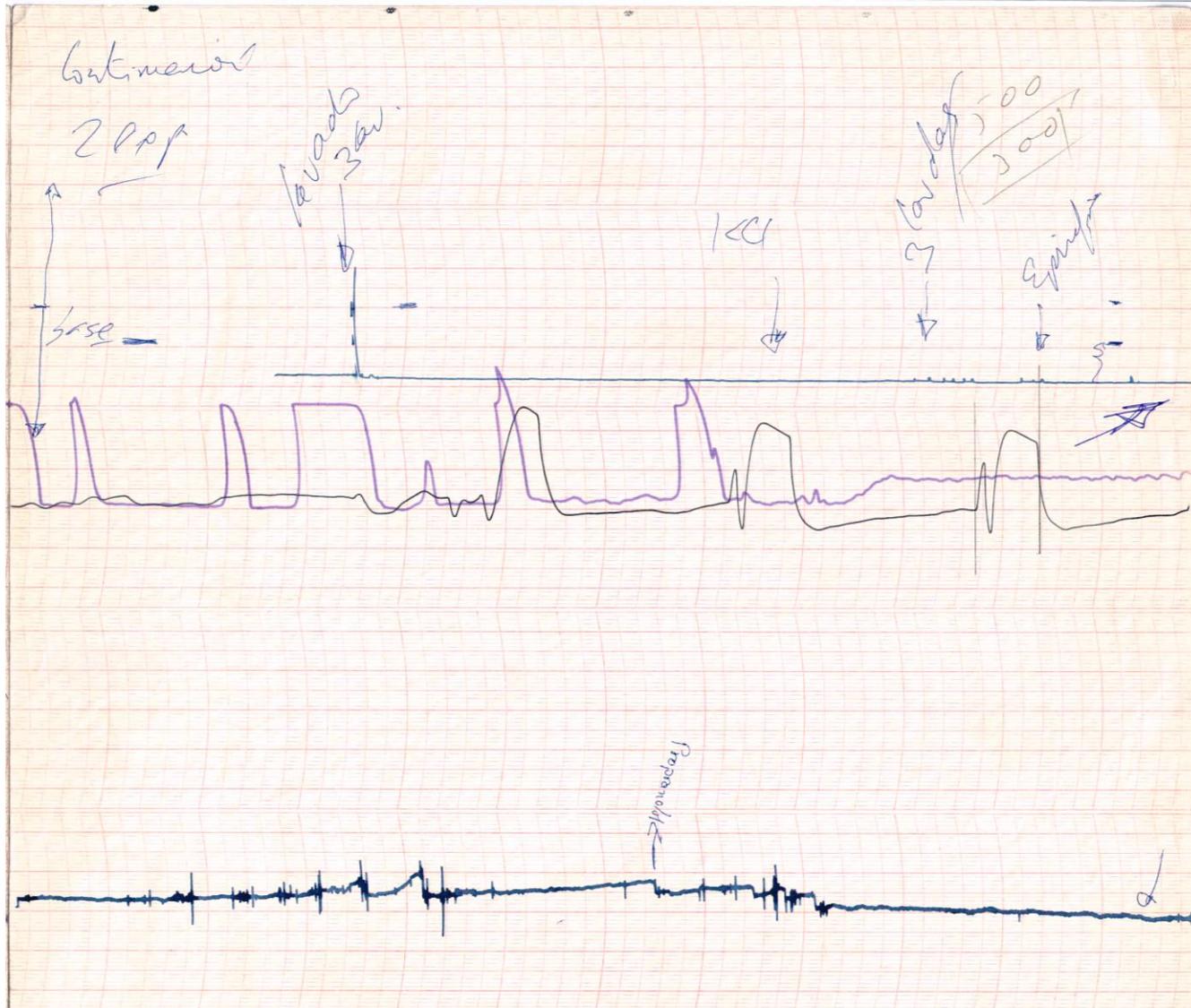


Anexo 6. Polígrafo: Resultados Noradrenalina-acetilcolina Fenilefrina-acetilcolina

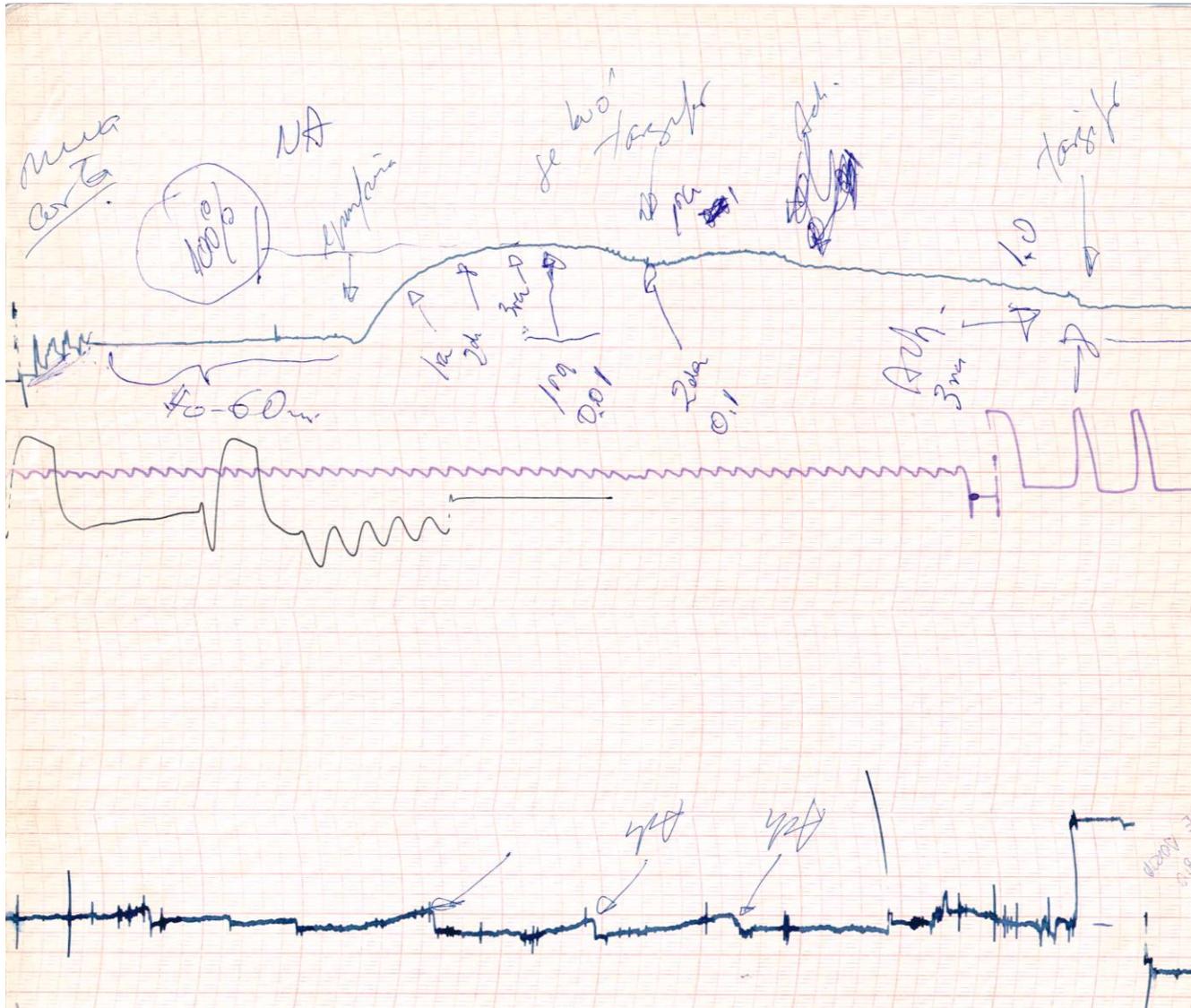




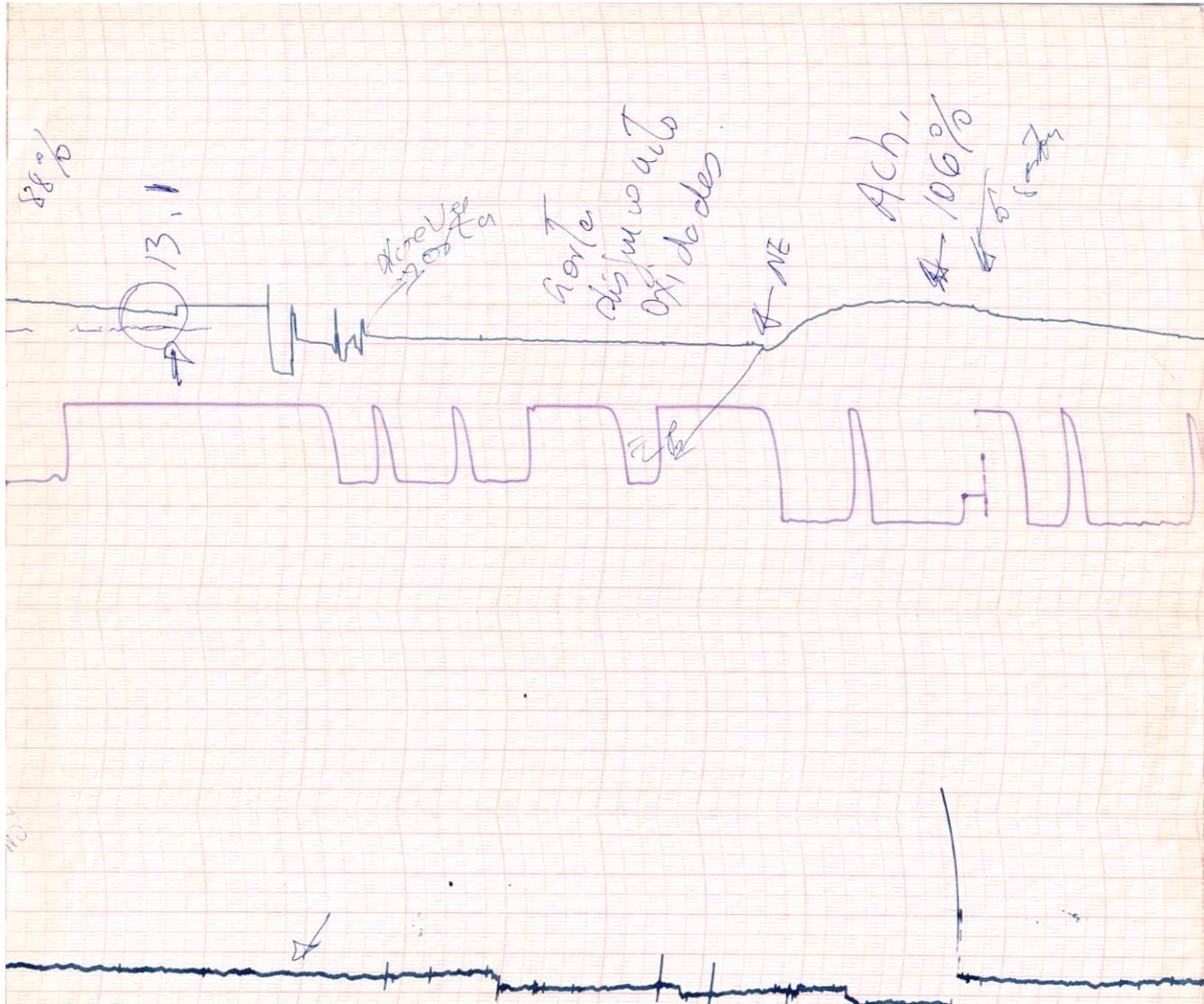
(Continúa siguiente página)



(Continúa siguiente página)



(Continúa siguiente página)



(Continúa siguiente página)

