

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

“IN SCIENTIA ET FIDE ERIT FORTITUDO NOSTRA”

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



**“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados
de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducida por
hiperglucemia aguda, Arequipa, 2016”**

Tesis Presentada por el Bachiller:

JIMMY ALEXANDER RAMOS CASTRO

**Para optar el título profesional de:
MÉDICO CIRUJANO**

AREQUIPA – PERU

2016

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
CAPÍTULO II.....	11
RESULTADOS	11
CAPÍTULO III	20
DISCUSIÓN Y COMENTARIOS	20
CAPÍTULO IV	26
CONCLUSIONES	26
CAPITULO V	28
RECOMENDACIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS	33
ANEXO 01	34
PROYECTO DE TESIS	34

RESUMEN

Introducción. En la actualidad la Diabetes Mellitus constituye un serio problema de salud pública, dentro de la patogénesis se estudian diversos elementos involucrados como el estrés oxidativo, lo que conlleva a disfunción endotelial.

Objetivo. Demostrar que la disfunción endotelial presente en anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas con hiperglucemia aguda inducida experimentalmente con estreptozotocina, altera su respuesta vasodilatadora al peróxido de hidrógeno.

Material y métodos. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anillos aórticos de ratas albinas (Wistar). Se usó anillos aórticos de ratas normales e hiperglucémicas en cámara de órganos aislados y se registró la actividad vasomotora con un transductor de tensión isométrica. Se produjo contracción fisiológica máxima con NA $5\mu M$ y se determinó el efecto vasodilatador con ACh a dosis de 0.1, 1 y $10\mu M$. Se comparó la inhibición de la vasoconstricción y la vasorelajación de anillos de rata con hiperglicemia, tras la incubación durante 2 horas con H_2O_2 a dosis de $10^{-4}M$.

Resultados. Después de aplicada la estreptozotocina la glucemia basal aumentó de 72,05 a 198,7mg/dl. Tras la preincubación con H_2O_2 se observó una reducción de la contracción fisiológica de 100 a 90.6%, e incrementó la vasodilatación de 37.8 a 68.3% comparado con el grupo hiperglucémico sin previa incubación en H_2O_2 .

Conclusiones. La administración en una sola dosis de estreptozotocina logró incrementar significativamente la glucemia en los animales tratados. La contracción obtenida con noradrenalina sobre anillos normoglucémicos alcanzó un máximo al cual se consideró como del 100%, luego la aplicación de acetilcolina promovió un efecto relajante dosis-respuesta. Por último la preincubación en peróxido de hidrógeno durante dos horas de los anillos aislados de aorta torácica de ratas con hiperglucemia (Diabéticas tipo I) disminuyó la respuesta vasoconstrictora de la noradrenalina sin embargo, incrementó significativamente la respuesta vasodilatadora de los anillos aórticos, deteriorada por la presencia de radicales libres inducidos por la producción de hiperglucemia aguda.

Palabras Clave: Diabetes Mellitus, Disfunción endotelial, Peróxido de Hidrógeno, H_2O_2 , Radicales Libre, vasodilatación, vasoconstricción

ABSTRACT

Introduction. Today Diabetes Mellitus is a serious public health problem within the pathogenesis various elements involved as oxidative stress are studied, leading to endothelial dysfunction.

Objective. Demonstrate that this endothelial dysfunction in isolated thoracic aortic rings from rats with experimentally induced acute hyperglycemia streptozotocin alters its vasodilatory response to hydrogen peroxide.

Material and methods. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and aortic rings of rats (Wistar). Aortic rings hyperglycemic and normal rats was used in isolated organs chamber and vasomotor activity was recorded with an isometric force transducer. Maximum physiological contraction occurred $10^{-5}M$ NA and ACh vasodilator effect was determined at doses of 0.1, 1 and 10 μM . Inhibition of vasoconstriction and vasorelaxation ring hyperglycemia rat was compared after incubation for 2 hours with a dose of $10^{-4}M$ H_2O_2 .

Results. Streptozotocin applied after the fasting glucose increased from 72.05 to 198,7mg / dl. After preincubation with H_2O_2 reduced physiological contraction 100 to 90.6% was observed vasodilation and increased 37.8 to 68.3% compared to the group without preincubation with H_2O_2 .

Conclusions. Administration in a single dose of streptozotocin achieved significantly increase in treated animals glycemia. The contraction obtained with noradrenaline on normoglycemic rings peaked which was considered as 100% after application of acetylcholine promoted a soothing dose-response effect. Finally preincubation hydrogen peroxide for two hours rings isolated thoracic aorta of rats with hyperglycemia decreased the vasoconstrictor noradrenaline response however, significantly increased vasodilatory response of aortic rings, impaired by presence of free radicals induced by the production of hyperglycemia.

Keywords: Diabetes Mellitus, endothelial dysfunction, hydrogen peroxide, H_2O_2 , Free Radicals, vasodilation

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la Diabetes Mellitus constituye un serio problema de salud pública, se calcula que en 2014 la prevalencia mundial de la diabetes fue del 9% entre los adultos mayores de 18 años (1). Varios factores se han asociado a la aparición de la diabetes mellitus, entre ellos la herencia, la alimentación, pero dentro de la patogénesis en la actualidad se señalan y se estudian otros elementos que podrían estar involucrados como: composición de ácidos grasos, alteraciones del óxido nítrico y el estrés oxidativo, lo que conlleva a disfunción endotelial en la cual predomina el efecto vasoconstrictor; es por ello que se deben incluir en estudios sobre su patogénesis para disminuir la incidencia de esta enfermedad y/o a minimizar las complicaciones crónicas de la misma.

En la década pasada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se relacionaba con daño oxidativo y lesión a nivel de ADN. Actualmente, el papel del H_2O_2 es esencial en la regulación de numerosos procesos fisiológicos/fisiopatológicos, teniendo una función destacada en la apoptosis/proliferación celular, hiperplasia, angiogénesis y contracción/relajación celular. En algunos de estos procesos se conoce perfectamente el rol del peróxido de hidrógeno, en otros no está clara su función, pero los distintos autores en el tema coinciden que el H_2O_2 juega un papel esencial. Es conocida que una de las principales acciones del H_2O_2 es su función en la regulación del tono vascular en los procesos de contracción/relajación. Sin embargo, existen múltiples interrogantes sobre la función del H_2O_2 sobre ciertos mecanismos intracelulares cuya importancia en la homeostasis celular ha sido descrito recientemente. En consecuencia en este estudio se analizó el papel del H_2O_2 en la regulación de la vasodilatación y vasoconstricción, en anillos de aorta de rata, resultado de la hiperglucemia aguda, por la presencia de altas concentraciones de oxidantes en el tejido vascular. Se produjo primero vasoconstricción fisiológica máxima con NA $5\mu M$ y se determinó el efecto vasodilatador con ACh a dosis de 0.1, 1 y $10\mu M$. Se comparó la inhibición de la vasoconstricción y la vasorelajación de anillos de rata con hiperglicemia, tras la incubación durante 2 horas con H_2O_2 a dosis de $10^{-4}M$. Los resultados demostraron que la incubación en peróxido de hidrógeno, en dosis de $10^{-4}M$ tuvo un efecto inhibitorio de la vasoconstricción sobre anillos aórticos de rata con hiperglicemia, mediado por la disminución del contenido celular del IP_3R y su consiguiente inhibición en la liberación de calcio; además presentó

un efecto vasodilatador por estimular la guanilato ciclasa soluble que conduce a un aumento de la concentración intracelular de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP).





CAPÍTULO I

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

- Quirófano para mamíferos inferiores con mesa de disección, calefacción y lámpara.
- Equipo de órganos aislados
- Polígrafo Grass de 10 canales
- Transductor de contracción isométrica Grass
- Balanza analítica: Sartorius Verke, serie 241.
- Agitador magnético/plancha térmica marca Lab-Line
- pHmetro digital marca Meter
- Osmómetro marca Somete
- Termómetro digital marca Parmer, Serie: 08403.
- Homogenizador eléctrico marca Sonic Lab.

RECURSOS

▪ Recursos humanos

Autor: Jimmy Alexander Ramos Castro

Asesor del trabajo: Dra. Noemí del Castillo Solórzano

Personal de apoyo

▪ Recursos materiales

❖ **Equipos:** CICA de la UCSM y CIDE de la Universidad Nacional de San Agustín

❖ **Reactivos y Fármacos:**

Estreptozotocina

Peróxido de hidrógeno

Noradrenalina

Acetilcolina

Solución buffer Krebs/Hepes (K-H) modificado para órganos aislados, su composición en mM: NaCl, 99.01; KCl, 4.69; CaCl₂, 1.87; MgSO₄, 1.20; K₂HPO₄, 1.03; NaHCO₃, 25.0; NaHepes, 20.0, y la glucosa, 11.1, (pH 7.4).

- **Recursos financieros**

Autofinanciado.

MÉTODOS

1.1 Determinación de la respuesta vascular

1.1.1 Obtención de los anillos aórticos.

Una vez sacrificados los animales mediante contusión cervical, por ser su muerte súbita y por lo tanto menos dolorosa, se les extrajo el segmento de aorta comprendido entre el arco aórtico y el diafragma. El cual fue rápidamente removido y depositado sobre una placa petri que contuvo una solución salina fisiológica (K-H) a 4°C. Luego de su prolija limpieza, eliminando la adventicia, el tejido conectivo periaórtico así como el tejido adiposo dentro de la solución salina que fue cambiada hasta en 3 oportunidades, se procedió a cortarla en anillos de $3,0 \pm 0,05$ mm de largo, mediante una guillotina múltiple diseñada para tal fin, extrayéndose al final 5 anillos de cada segmento.

1.1.2 Montaje de la preparación en la cámara de órganos

Uno a uno, los anillos disecados fueron insertados en la cámara de órganos aislados. Para ello, se los insertó en los dos ganchos de acero inoxidable presentes en el interior de la misma cuidando que el poste fijo cubra completamente al anillo mientras que el otro, que constituye el extremo terminal del transductor de tensión isométrica se pueda desplazar sin ninguna dificultad.

Realizada la operación anterior, se llenó el pozo de la cámara con 20 ml de la solución K-H la que fue oxigenada mediante burbujeo continuo con una mezcla carbógena de 95% de O₂ más 5% de CO₂. Gracias al empleo de un termociclador, que permite la circulación continua de agua por la doble pared de la cámara, se mantuvo la preparación a una temperatura de 37 ± 0.3 grados Celsius, El proceso de estabilización se logra dejando reposar la muestra durante 30 minutos como mínimo.

Tanto las contracciones como las relajaciones inducidas en los anillos aórticos, se expresaron en porcentaje con respecto a la máxima contracción obtenida con la solución $5\mu\text{M}$ de noradrenalina (100%): La determinación del patrón de vasodilatación en condiciones fisiológicas se consideró a la respuesta obtenida con acetilcolina a la concentración de $10\mu\text{M}$.

1. Con las aortas del Grupo Control se determinó el patrón de contracción mediante el empleo de una solución de noradrenalina $5\mu\text{M}$. A la máxima contracción desarrollada frente a la misma, se consideró arbitrariamente como la máxima respuesta fisiológica (100%) del anillo aislado. Seguidamente, se determinó la respuesta normal de relajación empleando tres dosis crecientes de acetilcolina. Para ello, una vez alcanzada la estabilización de la máxima contracción se agregó con un intervalo de aproximadamente 15min, 0,1, 1,0 y $10\mu\text{M}$ de acetilcolina observándose la respuesta vasodilatadora. La máxima deflexión (relajación) observada con esta última dosis se la consideró como la respuesta registrada en condiciones fisiológicas la que sirvió como patrón de vasodilatación para ser comparada, con las que se obtengan con los anillos de animales hiperglucémicos.
2. Uno por uno se fueron disponiendo los anillos aórticos obtenidos de los diferentes grupos en la cámara de órganos aislados para determinar la magnitud de su respuesta vasodilatadora previamente contraída con NA e incubada con peróxido de hidrógeno.

1. Campo de Verificación

1.1. Ubicación espacial:

El presente trabajo de Investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación de la Universidad Católica de Santa María (CICA) y Centro de Investigación y Desarrollo Científico de la Universidad Nacional de San Agustín

1.2. Ubicación temporal:

El estudio tuvo una duración de 10 semanas del 3 de Enero del 2016 al 06 de Marzo del 2016

1.3. Unidades de estudio:

La muestra Biológica estuvo constituida por 20 ratas albinas (Wistar) machos con un peso corporal entre 200 a 250g de 3 meses de edad pertenecientes a la misma camada obtenidas del Bioterio de la UCSM y CIDE de la UNSA.

Las unidades de estudio la fueron constituidos por anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglucémicas los cuales fueron distribuidos aleatoriamente según el protocolo de estudio.

1.3.1. Distribución de las unidades de estudio

Se distribuyó aleatoriamente de la siguiente manera:

1.3.1.1. **Grupo Hiperglucémico**, constituido por los anillos extraídos de 10 ratas normoglucémicas, la inducción de hiperglucemia aguda produjo un estado diabético en ratas. Para ello, en ayunas se administró en una sola dosis vía intraperitoneal (ip) 60 mg/kg de peso de estreptozotocina (SZT), la cual fue disuelta en buffer citrato a pH 4,5 y utilizada dentro de los 10 minutos de su preparación. (2)

1.3.1.2. **Grupo Control**: fue constituido igualmente por anillos obtenidos de 10 animales normales.

2. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

2.1. Organización

Para la realización de la presente tesis se procedió de la siguiente manera:

2.1.1. Etapa pre-experimental

Se realizaron las pruebas piloto con el fin de determinar las dosis de los fármacos a utilizar así como realizar los ensayos de obtención y manejo de los anillos de aorta aislados.

2.1.2. Etapa de estandarización

La condiciones tanto ambientales como de alimentación fueron estandarizadas de tal manera, que se mantuvo a los animales en jaulas separadas a una temperatura ambiental de 24°C con humedad relativa del 30%. Pasando por períodos de luz oscuridad cada 12 horas. La alimentación fue la misma, durante todo el tiempo en que duró el estudio y estuvo constituida por 30g de

concentrado para mantenimiento marca TOMASINO® administrados a la misma hora del día y el agua ad libitum.

2.1.3. Etapa experimental

Esta se inició con la determinación de la respuesta vasoactiva de los anillos aórticos al peróxido de hidrógeno en la cámara de órganos aislados.

2.2. Criterios o estrategias para el manejo de resultados

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

Por lo que se calculó los siguientes estadígrafos:

Medidas de tendencia central, media desviación estándar t de Students para hallar la diferencia entre dos medias independientes. Para el efecto del tratamiento se realizó el Análisis de Varianza Simple (ANDEVA). La Prueba de sensibilidad de Tukey modificada permitió determinar la efectividad del tratamiento en el tiempo.

Las diferencias se consideraron como:

No significativas $p > 0,05$

Significativas $p < 0,05$

Altamente significativas $p < 0,01$



CAPÍTULO II

RESULTADOS

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Tabla 1.

HIPERGLUCEMIA AGUDA INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS

Efecto de la administración vía intravenosa de estreptozotocina sobre los niveles de glicemia (mg/dl) en el Grupo Hiperglucémico versus el Grupo Control empleando un placebo.

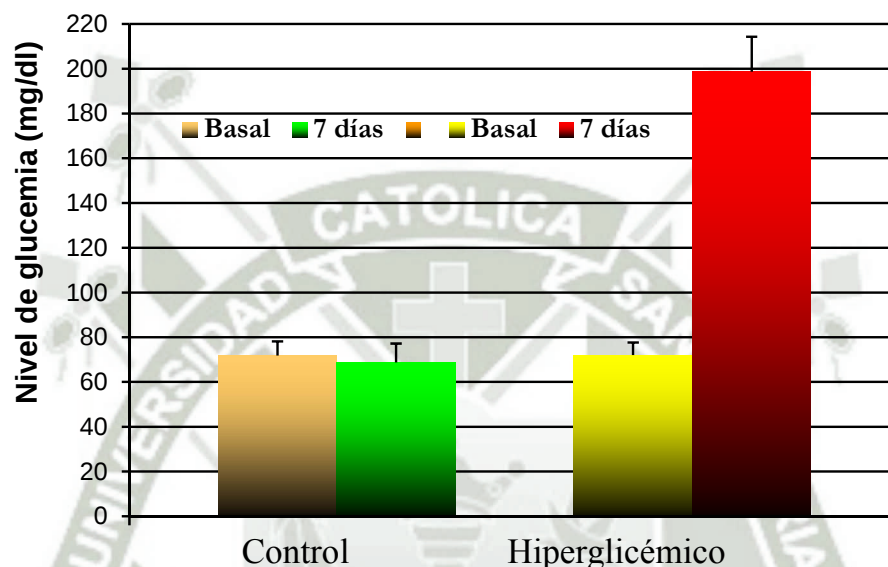
CONDICIÓN	GRUPOS DE ESTUDIO		Prueba t
	Control	Hiperglucémicas	
Basal X ± DE	71,8 ± 10,6	72,05 ± 9,2	n.s.
Después de 7 días X ± DE	68,8 ± 9,9	198,7 ± 13,7	P<0,01
Prueba t	n.s.	P<0,01	
n	12	12	

- Cada punto representa la media de 12 muestras de valores de glucemia expresados en mg/dl ± la desviación estándar de la media (DS).
- Se realizó la prueba “t” de Student para datos pareados (basal e hiperglucémicos).
- n, tamaño de la muestra

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Figura 1.

HIPLERGLUCEMIA AGUDA INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS



En la presenta tabla y figura se analizó en primer lugar los niveles de glucemia alcanzados por los animales pertenecientes al grupo Hiperglúcemico tratadas con estreptozotocina. Así observamos en la tabla 1 y su respectiva figura el incremento altamente significativo de la cantidad de glucosa en plasma obtenida después de 7 días de haber administrado estreptozotocina vía intravenosa en una sola dosis. De 72,05 de glucemia basal aumentó a 198,7mg/dl después de aplicada la droga. La prueba t aplicada a las medias, señaló una alta diferencia significativa ($p < 0,01$) lo cual demostró la efectividad del método para inducir hiperglucemia en ratas. Por su lado, los animales pertenecientes al Grupo Control mantuvieron un valor promedio de glicemia de 68,8mg/dl después de 7 días.

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Tabla 2.

RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS NORMALES DEPENDIENTE DE NORADRENALINA Y ACETILCOLINA

Obtención del patrón de contracción y relajación fisiológicos de anillos aórticos de ratas normales en respuesta a la administración de noradrenalina (5 μ M) y acetilcolina (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) respectivamente.

Tiempo (min)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Noradrenalina	0	61,3 a	80,2 b	86,9 b	95,1 c	98,9 c	99,7 c	100,0 c	100 c	100 c	99,9 c
$\pm$ DE	0	6,2	6,3	6,9	7,5	6,8	7,2	8,2	6,3	7,2	7,6

Dosis de acetilcolina	0,1 μ M				1,0 μ M				10 μ M		
Normoglucémica	100 a	92,1 a	88,1 a	87,3 a	68,9 b	65,4 b	62,9 b	29,2 c	26,5 c	26,7 c	26,2 c
$\pm$ DE	6,1	7,2	6,6	7,5	6,8	5,9	4,7	3,8	3,1	1,8	1,1

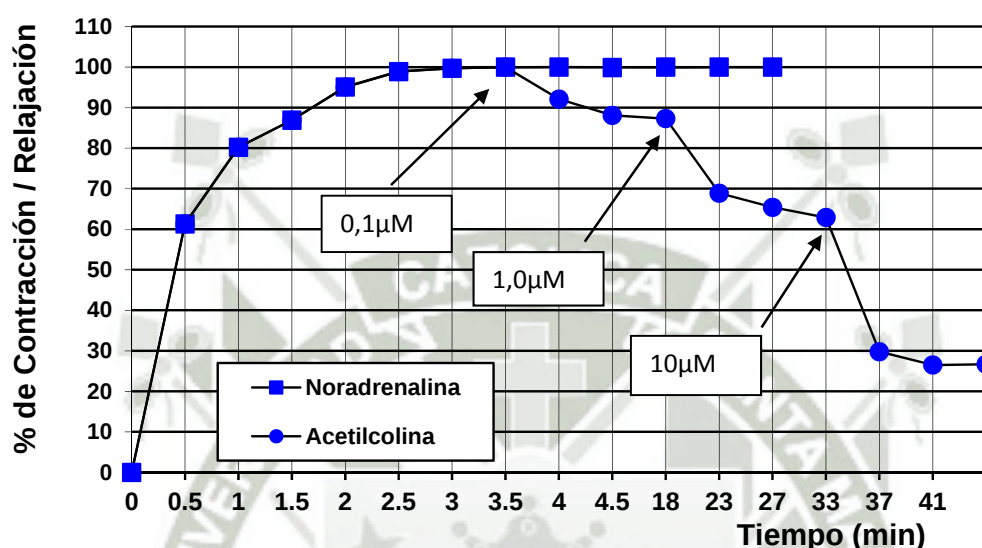
- Los resultados se expresan como porcentaje (Media $\pm$ desviación estándar, DE).
- Las flechas indican el momento de la administración de las dosis de acetilcolina una vez alcanzado los anillos su máxima contracción con noradrenalina.
- Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y el test de especificidad de Tukey modificado para determinar las diferencias significativas entre medias con una exigencia del 99%. n, tamaño de la muestra (5 anillos). Letras similares, no hay diferencia significativa ($p > 0,05$), letras diferentes sí ($p < 0,01$).

En cada una de las tablas de los resultados presentados en este estudio se muestra para cada tiempo, el valor en porcentaje, después de haber promediado cinco respuestas, el efecto vasoconstrictor o vasodilatador. El patrón de contracción máxima obtenido demuestra que los anillos aórticos utilizados se encontraban en perfectas condiciones para poder realizar los experimentos posteriores.

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Figura 2.

RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS NORMALES DEPENDIENTE DE NORADRENALINA Y ACETILCOLINA



El objetivo de la tesis de analizar el papel del H_2O_2 en la regulación de los mecanismos contráctiles y relajantes, “*in vitro*” ese analizan en las siguientes tablas. Para ello, se obtuvieron los valores patrón “fisiológicos” de contracción (noradrenalina) y relajación (acetilcolina) mostrados en la tabla y figura 2.

En el grupo Control como se observa en la tabla y figura 2, la máxima contracción con Noradrenalina a $5\mu M$ se alcanzó al minuto 3.5 considerándose dicho valor como 100%, momento en el cual se agregó la ACh. Es de notar por los resultados en esta figura, que la respuesta contráctil desarrolla el 50 por ciento de su efecto, durante los 30 primeros segundos, demorándose el resto del tiempo (3.5 minutos) en alcanzar su efecto máximo. Con respecto a la respuesta del tejido vascular frente a la ACh, observamos que a través del tiempo, el efecto de $10\mu M$ del neurotransmisor presenta su típica respuesta vasodilatadora de 73,8% que genera en endotelios normales. El estudio de la pendiente muestra un efecto inmediato vasorelajante aproximadamente entre el minuto 27 y 33 alcanza el 50% de la relajación total para luego descender lentamente hasta el minuto 41 en que consigue su máxima dilatación. Esta respuesta vasodilatadora nos servirá como patrón a ser comparada con las aortas disfuncionantes.

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Tabla 3.

RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS HIPERGLÚCEMICAS DEPENDIENTE DE NORADRENALINA Y ACETILCOLINA

Efecto de los radicales libres sobre la relajación vascular de anillos aórticos de ratas hiperglucémicas en respuesta a 3 dosis crecientes de acetilcolina (0,1μM, 1μM, 10μM) previamente contraídos con noradrenalina 5μM.

Tiempo (min)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Noradrenalina	0	68,7 a	87,5 b	92,4 b	99,3 C	102,9 c	106,9 c	106,4 c	105,8 c	106,9 c	106,8 c
± DE	0	8,4	9,7	6,9	11,2	9,9	10,7	11,8	10,6	12,5	13,0

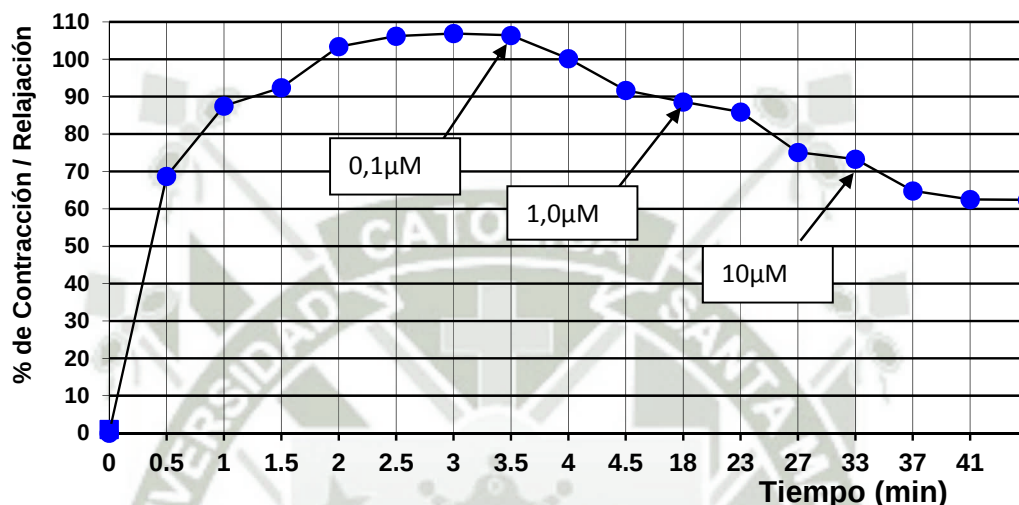
Dosis de acetilcolina	0,1μM				1,0μM				10μM		
Hiperglucémica	106,4 a	100,2 a	91,7 a	88,6 b	85,9 B	75,1 b	73,3 b	64,8 c	62,5 c	62,4 c	62,2 c
± DE	12,4	8,8	9,5	9,1	8,7	6,4	7,7	8,2	7,9	6,4	5,5

- Los resultados se expresan como porcentaje (Media ± desviación estándar, DE).
- Las flechas indican el momento de la administración de las dosis de acetilcolina una vez alcanzado los anillos su máxima contracción con noradrenalina.
- Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y el test de especificidad de Tukey modificado para determinar las diferencias significativas entre medias con una exigencia del 95%.
- n, tamaño de la muestra (5 anillos).
- Letras similares, no hay diferencia significativa ($p > 0,05$), letras diferentes sí $p < 0,05$.

En ambos grupos experimentales se observó una respuesta vasodilatadora dependiente de la dosis alcanzando su mayor valor con la concentración de 10μM (37.8% para los anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas versus 73.8% para los anillos de ratas control). Al aplicar la prueba t de Student, ésta arroja una diferencia significativa entre anillos diabéticos y control a la concentración de ACh de 0,1μM ($p < 0,05$), mientras que una diferencia altamente significativas ($p < 0,01$) en las concentraciones de 1μM y 10μM.

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Figura 3.
RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS
DIABÉTICAS DEPENDIENTE DE NORADRENALINA Y ACETILCOLINA



Obtenidos los valores patrón, los mismos que se determinaron una vez instalados los anillos de aorta de rata con hiperglucemia, se procedió con el protocolo experimental, como se presenta en la tabla y figura 3, el cual se inicia con la obtención de la respuesta contráctil con noradrenalina a $5\mu\text{M}$ alcanzando entre el minuto 3 y 3.5 el mayor valor de 106,9%, siendo ésta mayor a la respuesta contráctil máxima del grupo control considerada como 100%. Posteriormente se procedió a obtención de la respuesta relajante empleando 3 dosis crecientes de ACh sobre anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas. Así, empleando dosis de ($0,1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$) se observó que el efecto relajante sobre los anillos previamente contraídos con Noradrenalina fue dependiente de la dosis y que la existencia de hiperglucemia (anillos diabéticos) indujo una respuesta vasodilatadora menor que en los anillos procedentes de animales del grupo control.

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Tabla 4.

RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS CON HIPERGLUCEMIA, PREINCUBADAS CON PEROXIDO DE HIDROGENO, DEPENDIENTE DE NORADRENALINA y ACETILCOLINA.

Efecto de la preincubación con peróxido de hidrógeno ($10^{-4}M$) durante dos horas sobre la relajación vascular de anillos aórticos de ratas hiperglucémicas en respuesta a la administración de tres dosis crecientes de acetilcolina ($0,1\mu M$, $1\mu M$, $10\mu M$) previamente contraídos con noradrenalina ($5\mu M$).

Tiempo (min)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Noradrenalina	0	61,3 a	75,7 b	80,9 c	82,2 c	87,1 c	90,6 c	90,2 c	86,3 c	87,3 c	86,4 c
± DE	0	5,1	7,2	4,8	6,5	6,3	8,5	8,9	7,6	7,4	7,9

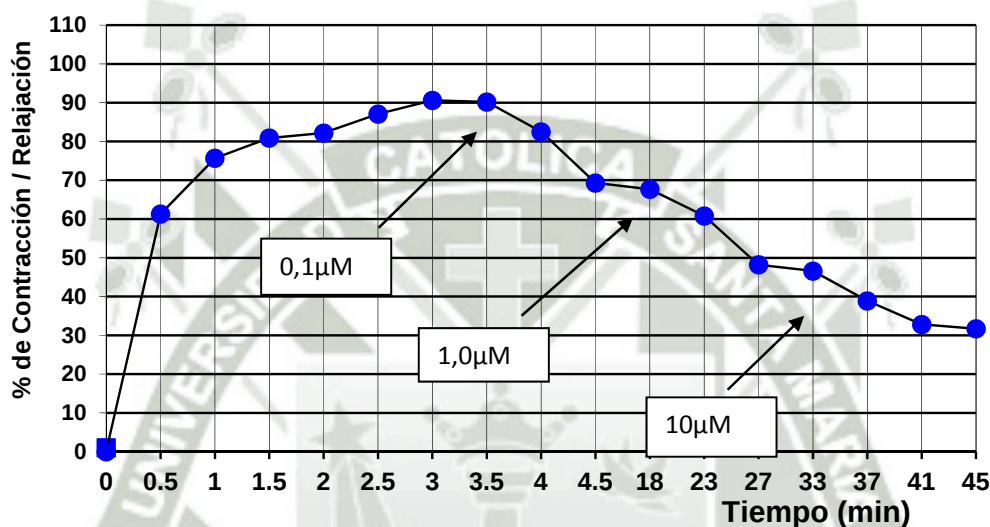
Dosis de acetilcolina	0,1uM			1,0uM			10uM				
Hiperglucémica	90,2 a	82,5 a	69,3 a	67,7 a	68,8 a	48,2 b	46,6 b	38,9 b	32,8 c	31,7 c	31,9 c
± DE	8,6	9,0	5,7	7,8	7,3	5,1	4,8	5,2	4,3	3,6	4,2

- Los resultados se expresan como porcentaje (Media $\pm$ desviación estándar, DE).
- Las flechas indican el momento de la administración de las dosis de acetilcolina una vez alcanzado los anillos su máxima contracción con noradrenalina.
- Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y el test de especificidad de Tukey modificado para determinar las diferencias significativas entre medias con una exigencia del 99%. n, tamaño de la muestra (5 anillos).
Letras similares, no hay diferencia significativa ($p > 0,05$), letras diferentes sí $p < 0,05$.

“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglicemia aguda, Arequipa, 2016”

Figura 4.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS CON HIPERGLUCEMIA, PREINCUBADAS CON PEROXIDO DE HIDROGENO, DEPENDIENTE DE NORADRENALINA y ACETILCOLINA.



Después de incubados en H_2O_2 los anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas por 2 horas, se procedió con la obtención de la respuesta contráctil con noradrenalina a $5\mu M$ alcanzando entre el minuto 3 y 3.5 el mayor valor de 90,6% mostradas en la figura y tabla 4. Posteriormente se procedió a la obtención de la respuesta relajante empleando 3 dosis crecientes de ACh sobre anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas. Así, empleando dosis de ($0,1\mu M$, $1\mu M$ y $10\mu M$) se observó que el efecto relajante sobre los anillos previamente contraídos con Noradrenalina fue dependiente de la dosis y de la existencia de hiperglicemia (anillos diabéticos preincubados en H_2O_2), se indujo una respuesta vasodilatadora encontrando el valor máximo de 68.3% obtenido al minuto 45, la incubación con H_2O_2 provocó la inhibición de la vasoconstricción en los anillos aórticos de rata con hiperglicemia (Figura 4).



CAPÍTULO III

DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

EVALUACIÓN DE LA HIPERGLUCEMIA EXPERIMENTAL INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS

La estreptozocina es un medicamento utilizado en quimioterapia para el tratamiento de determinados tumores del páncreas, posee una acción citotóxica selectiva sobre las células beta del páncreas. Se clasifica como un agente alquilante del grupo de la nitrosureas, los cuales atraviesan la barrera hematoencefálica. Los agentes alquilantes alcanzan su mayor nivel de actividad durante la fase de reposo celular, por lo que este fármaco no es específico al ciclo celular.

Al administrar estreptozotocina vía intraperitoneal en las ratas del grupo hiperglucémico se produjo Diabetes Mellitus tipo 1, como se observa en la tabla y figura 1, por lo que se incrementó el valor de la glucosa sanguínea de 72,05 mg/dl a 198,7 mg/dl 7 días después de aplicada la droga. Se encontró una alta diferencia significativa ($p < 0,001$) lo cual demostró la efectividad del método para inducir diabetes en ratas. Sin embargo los animales pertenecientes al Grupo Control mantuvieron un valor promedio normal después de 7 días.

FUNCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE EL RECEPTOR DE INOSITOL 1, 4,5-TRIFOSFATO (IP_3) Y LA ENZIMA GUANILATO CICLASA SOLUBLE

Es un hecho bien documentado que diversas sustancias contráctiles, cuyo mecanismo de acción es a través de la formación de IP_3 , disminuyen los niveles del Receptor de Inositol 1, 4,5-trifosfato (IP_3R). Existe numerosa bibliografía que le otorga al H_2O_2 un efecto contráctil por un aumento de calcio intracelular.

Los resultados obtenidos por Garrido, 2007 (3) nos muestran una disminución en la cantidad del Receptor de IP_3 tipo I y el Receptor de IP_3 tipo III en células musculares lisas (CML) tratadas con H_2O_2 . La disminución se puede interpretar como un mecanismo de defensa celular frente a un estímulo contráctil. Esta disminución fue dosis y tiempo dependiente, alcanzándose el máximo a las 6 horas de tratamiento con H_2O_2 a una dosis de $10^{-4}M$. Para comprobar que la dosis máxima utilizada ($10^{-4}M$) no era tóxica para la célula, se realizaron ensayos de la viabilidad celular por citometría de flujo y los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de las CML tratadas con H_2O_2 a una dosis de $10^{-4}M$ durante 8 horas no resultaba tóxica, resultado confirmado

además por otros autores como Lee KH. y cols, 2004 (4). Como ya se indicó, el papel contráctil del H_2O_2 es mediado por un aumento de calcio intracelular. Aunque la procedencia del calcio aún no se identifica claramente, así por ejemplo algunos autores como Zheng Y. & Shen X., 2005 (5) lo atribuyen a una activación de los receptores de IP_3 , y otros como Granado PM y cols., 2006 (6) muestran que su procedencia es mitocondrial, los distintos estudios coinciden en la ausencia de la elevación de los niveles de IP_3 intracelulares.

El Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) actúa como canales de calcio permitiendo movilizarse al calcio desde los almacenes intracelulares hacia el citosol. En el estudio realizado por Garrido, 2007 (3) una vez que observó la disminución del contenido celular del IP_3R , procedió a evaluar la importancia funcional de esta disminución, analizando la respuesta celular al tratamiento con IP_3 . Los resultados obtenidos mostraron una inhibición en la liberación de calcio por IP_3 en CML tratadas con H_2O_2 , con respecto a sus controles. Para confirmar la importancia funcional de la disminución del contenido celular del IP_3R inducido por H_2O_2 se realizó el análisis de la respuesta vasoconstrictora de las células en presencia de un agonista como la Angiotensina II donde se observó una disminución de la vasoconstricción cuando las CML eran preincubadas con H_2O_2 , siendo esta disminución proporcional a la obtenida en la liberación de calcio por IP_3 ; dicho resultado fue similar al encontrado en nuestro estudio que se muestran en la tabla y figura 4 realizados en anillos de aorta de ratas con hiperglucemia preincubadas en H_2O_2 y su disminución de la respuesta vasoconstrictora a la noradrenalina. Los resultados presentados por Garrido, 2007 (3) también mostraron una disminución en el contenido y actividad del IP_3R_1 e IP_3R_3 en CML de aortas tratadas con H_2O_2 . Este efecto fue acompañado de una menor respuesta contráctil de las CML a Angiotensina II. Por otro lado, demostró el papel esencial de la generación H_2O_2 regulando dos mecanismos celulares críticos en el proceso de contracción-relajación, los sistemas de respuesta al IP_3 y al Óxido Nítrico (ON). En conclusión el H_2O_2 disminuyó la cantidad del IP_3R_1 e IP_3R_3 en CML, este efecto se acompañó de una menor liberación de calcio inducida por IP_3 , así como de una menor respuesta contráctil frente a Angiotensina II.

La fase final de la vía endotelial se lleva a cabo cuando el óxido nítrico provoca la formación de GMP cíclico por las enzimas guanilato ciclasas en el músculo liso vascular, para posteriormente, a través de este, desencadenar los mecanismos

intracelulares que lleven a la relajación de los vasos sanguíneos, es por ello que la capacidad del H_2O_2 para estimular la guanilato ciclasa soluble podría hacer pensar que se trata de un mediador con una cierta capacidad relajante como se demuestra en el presente estudio mediante la incubación en H_2O_2 de anillos de aorta de rata con hiperglucemia.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS NORMALES Y DIABÉTICAS DEPENDIENTE DE NORADRENALINA Y ACETILCOLINA

Noradrenalina es una catecolamina natural, que genera vasoconstricción al activar receptores adrenérgicos en aorta (Fauaz y col., 2000) (7). Se ha utilizado para la vasoconstricción de aorta de rata aislada, donde se han investigado mecanismos de vasorelajación (Adegunloye y col., 1996 (8); Iturriaga, 2001 (9); Ziyat y col., 2002 (10)). La vasorelajación se produciría por mecanismos dependientes del endotelio como de la musculatura lisa vascular, por esto se realizan estudios en anillos de aorta con endotelio y sin endotelio (Kuramochi y col. (11), 1994; Ziyat y col., 2002 (10)).

Acetilcolina (ACh), a pesar de carecer virtualmente de aplicaciones terapéuticas (Hardman y col., 2001 (12)), es usada en el estudio de la fisiología vascular (Pérez y col., 2002 (13)). La dilatación de los lechos vasculares por acetilcolina se debe a la presencia de receptores muscarínicos, primordialmente del tipo M_3 (Jaiswal y col., 1991 (14); Bruning y col., 1994 (15)). Cuando se estimulan los receptores M_3 ubicado a nivel endotelial en la aorta de rata, las células endoteliales descargan factor relajante derivado de endotelio u NO, el que difunde hacia las células del músculo liso adyacente, produciéndose la relajación en ratas normotensas (Neelam y col., 1991 (16); Boulanger y col., 1994 (17)) demostrándose que el efecto vasodilatador de la acetilcolina necesita de la integridad del endotelio para realizarse (vasodilatación dependiente del endotelio).

En el grupo Control como se observa en la tabla y figura 2, la máxima contracción con Noradrenalina a una concentración de $5\mu M$ se alcanzó al minuto 3.5 considerándose dicho valor como 100%, momento en el cual se agregó la ACh a una concentración de $10\mu M$ del neurotransmisor presenta su típica respuesta vasodilatadora que genera en endotelios normales de 73,8% en el minuto 41 en que consigue su máxima dilatación. Esta respuesta vasodilatadora se utilizó como patrón para ser comparada con las aortas disfuncionantes; los cuales presentaron una contracción máxima con noradrenalina de

106,9%, siendo ésta mayor a la respuesta contráctil máxima del grupo control considerada como 100%. Posteriormente la respuesta relajante empleando 3 dosis crecientes de ACh (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M) sobre anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas, se observó que el efecto relajante sobre los anillos previamente contraídos con Noradrenalina fue dependiente de la dosis y que la existencia de hiperglicemia (anillos diabéticos) indujo una respuesta vasodilatadora menor que en los anillos procedentes de animales del grupo control. El deterioro de la relajación demuestra un endotelio alterado conocido como disfunción endotelial debido al incremento de la producción de radicales libres procedentes del oxígeno (EROS) en las 3 concentraciones estudiadas. En ambos grupos experimentales se observó una respuesta vasodilatadora dependiente de la dosis alcanzando su mayor valor con la concentración de 10 μ M (37.8% para los anillos aórticos procedentes de ratas hiperglucémicas versus 73.8% para los anillos de ratas control). Al aplicar la prueba t de Student, ésta arroja una diferencia significativa entre anillos diabéticos y control a la concentración de ACh de 0,1 μ M ($p < 0,05$), mientras que una diferencia altamente significativas ($p < 0,01$) en las concentraciones de 1 μ M y 10 μ M.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA VASOACTIVA EN ANILLOS DE AORTA DE RATAS CON HIPERGLUCEMIA, PREINCUBADAS CON PEROXIDO DE HIDROGENO, DEPENDIENTE DE NORADRENALINA y ACETILCOLINA.

Después de incubados en H₂O₂ los anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas, la respuesta contráctil con noradrenalina a 5 μ M alcanzando el valor máximo de 90,6% mostradas en la figura y tabla 4, siendo ésta menor a la respuesta de los dos resultados obtenidos anteriormente en el grupo control considerada como 100% (tabla 2) y el grupo diabético sin previa incubación en H₂O₂ donde se obtuvo el 106.9% de respuesta contráctil (tabla 3). Se puede deducir que la incubación en peróxido de hidrógeno, en dosis de 10⁻⁴ M tuvo un efecto inhibitor de la vasoconstricción sobre anillos aórticos de rata con hiperglucemia, mediado por la disminución del contenido celular del IP₃R y su consiguiente inhibición en la liberación de calcio. Posteriormente en la respuesta relajante empleando 3 dosis crecientes de ACh (0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M) sobre anillos aórticos procedentes de ratas diabéticas se observó que el efecto relajante sobre los anillos previamente contraídos con Noradrenalina fue dependiente de la dosis y de la existencia de hiperglucemia (anillos diabéticos preincubados en H₂O₂), el valor máximo la respuesta vasodilatadora fue de 68.3% obtenido al minuto 45, dicho valor fue menor

y estadísticamente no significativo, comparado con el obtenido en anillos procedentes de animales del grupo control (73,8%); sin embargo fue mayor y estadísticamente significativo comparado con el resultado dilatador en anillos procedentes de animales diabéticos sin previa incubación en H_2O_2 (37.8%) . Es decir los resultados observados en la figura y tabla 4 también mostraron un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la vasorelajación inducida con acetilcolina comparada con el Grupo Hiperglucémico (tabla 2); la incubación con H_2O_2 provocó la inhibición de la vasoconstricción en los anillos aórticos de rata con hiperglucemia (Figura 4) y resultó significativa al compararla con el patrón de máxima contracción (Figura 2). Dicho efecto vasodilatador fue mediado por el aumento sobre el contenido de guanilo ciclasa soluble que conduce a un aumento de la concentración intracelular de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), estando implicado en este proceso un aumento de la estabilidad del mRNA, o una disminución de la tasa de degradación por el proteasoma.





CAPÍTULO IV

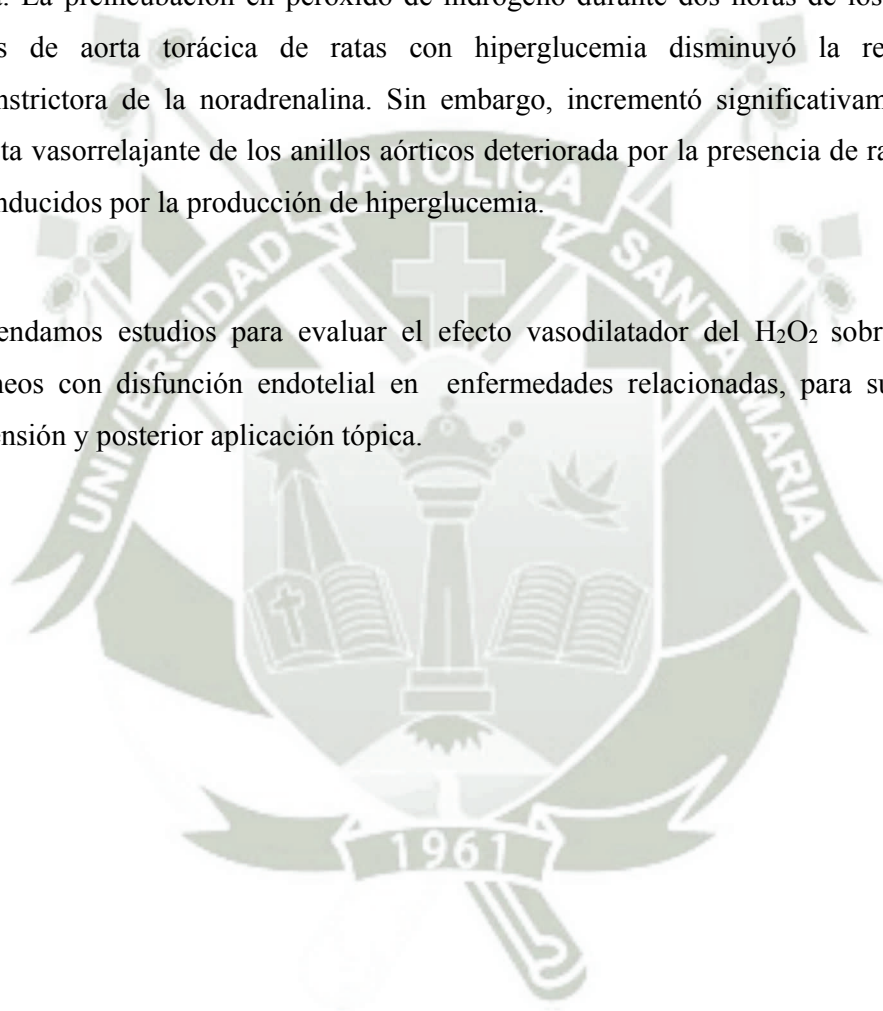
CONCLUSIONES

Primera. La administración en una sola dosis de estreptozotocina logro incrementar significativamente la glucemia en los animales tratados. Manteniéndose en esa condición durante todo el tiempo que duró la parte experimental del estudio.

Segunda. La contracción obtenida con noradrenalina sobre anillos normoglucémicos alcanzó un máximo al cual se consideró como del 100%, luego la aplicación de acetilcolina promovió un efecto relajante dosis-respuesta.

Tercera. La preincubación en peróxido de hidrógeno durante dos horas de los anillos aislados de aorta torácica de ratas con hiperglucemia disminuyó la respuesta vasoconstrictora de la noradrenalina. Sin embargo, incrementó significativamente la respuesta vasorrelajante de los anillos aórticos deteriorada por la presencia de radicales libres inducidos por la producción de hiperglucemia.

Recomendamos estudios para evaluar el efecto vasodilatador del H_2O_2 sobre vasos sanguíneos con disfunción endotelial en enfermedades relacionadas, para su mejor comprensión y posterior aplicación tópica.



CAPITULO V
RECOMENDACIONES

1. Promover la divulgación del presente estudio.
2. Se debe realizar estudios para evaluar el efecto vasoactivo del Peróxido de Hidrógeno en arteria de cordón umbilical de humanos, para su posterior aplicación en humanos.
3. Continuar estudios de toxicidad a diferentes concentraciones del Peróxido de Hidrógeno





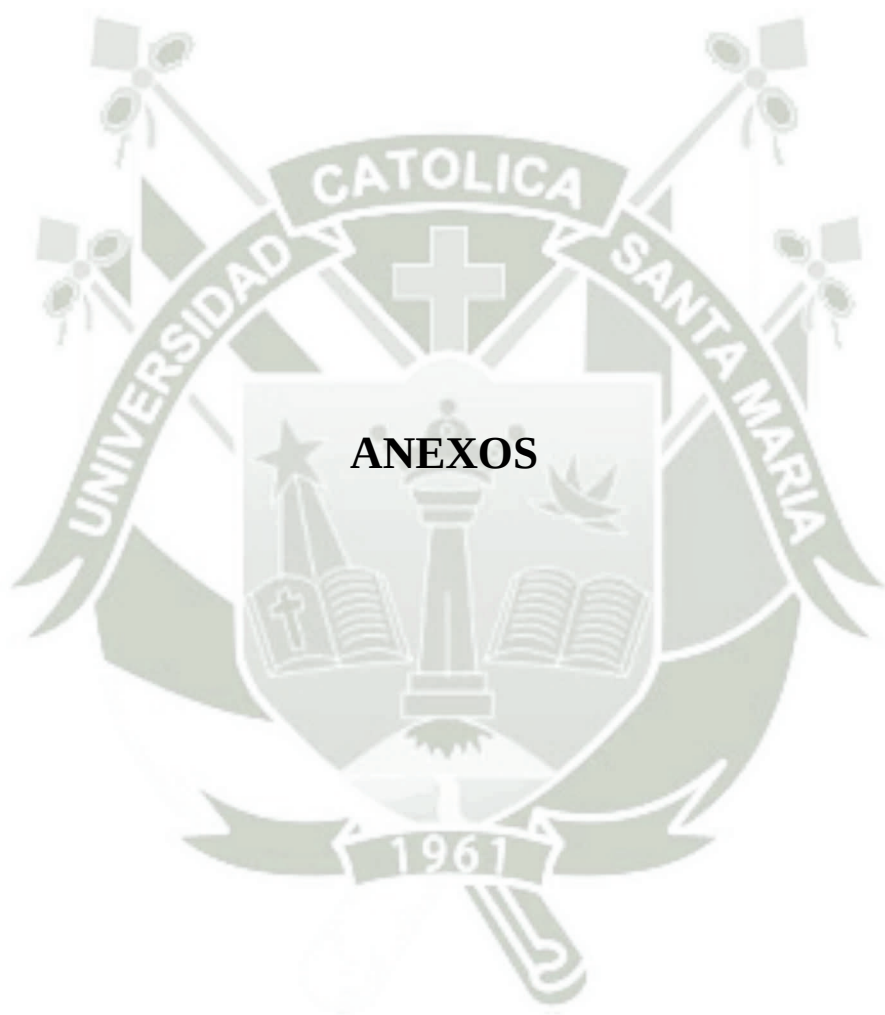
BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva; 2012.
2. García D. Influencia de la Diabetes Experimental en Respuestas Serotonérgicas a nivel Cardiovascular Renal. Tesis de Doctorado publicada. Universidad de Salamanca. 2005.
3. Martín A. EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO MEDIADOR EN EL PROCESO DE CONTRACCIÓN-RELAJACIÓN ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá. 2007.
4. Lee K., Lim S., Kang S., Kim D., Cho H., Chung J., et al. Antiproliferative mechanisms of raxofelast (IRFI-016) in H₂O₂-stimulated rat aortic smooth muscle cells. Eur J Pharmacol. 2004 enero; 484: p. 119-125.
5. Zheng Y., Shen X. H₂O₂ directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells. Redox Rep. 2005; 10: p. 29-36.
6. Granados M., Salido G., Gonzalez A., Pariente J. Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. Biochem Cell Biol. 2006; p. 39-48.
7. Fauaz, G., T. Feres, A. Borges, T. Paiva. Alpha-2 adrenoceptors are present in rat aorta smooth muscle cell, and their action is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. Br. J. Pharmacol. 2000; 131: p. 788-794.
8. ADEGUNLOYE B., OMONIYI J., OWOLABI O., AJAGBONNA O. Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of Hibiscus sabdariffa in rats. Afr. J. Med. Med. Sci. 1996; 25: p. 235-238.
9. Iturriaga P. Análogos simplificados de alcaloides bisbencilisoquinolinicos como posibles relajantes musculares. Tesis para Doctorado. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. In. Santiago; 2001.
10. ZIYYAT A., MEKHFI H., BNOUHAM M., TAHRI A., LEGSSYER A., HOERTER J., FISCHMEISTER R. Arbutus unedo induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. Phytother. Res. 2002; 16: p. 572-575.
11. KURAMOCHI T., CHU J., SUGA T. Gou-teng (from Uncaria rhynchophylla Miquel) induced endothelium-dependent and independent relaxations in the isolated rat aorta. Life Sci. 1994; 54: p. 2061-2069.
12. HARDMAN J., LIMBIRD L., GILMAN A. The pharmacological basis of therapeutics. In. New York: McGraw-Hill; 1996.
13. PÉREZ F., COGOLLUDO A., LÓPEZ J., ZARAGOZÁ F., IBARRA M. Respuesta de las arterias pulmonares de lechón al óxido nítrico y a dadores de óxido nítrico: Evolución con la edad postnatal y modulación por el estrés oxidativo. Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002; 68: p. 58-100.
14. JAISWAL N., LAMBRECHT G., MUTSCHLER E., TACKE R., MALIK K. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1991; 258: p. 842-850.
15. BRUNING T., HENDRIKS M., CHANG P., KUYPERS E., ZWIETEN P. In vivo characterization of vasodilating muscarinic receptor subtypes in humans. Circ. Res. 1994; 74: p. 912-919.
16. NEELAM J., LAMBRECHT G., MUTSCHLER E., TACKE R., MALIK K.

Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 258: p. 842-850.

17. BOULANGER C., MORRISON K., VANHOUTTE P. Mediation by M3 muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 112: p. 519-524.







ANEXO 01
PROYECTO DE TESIS

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

PROGRAMA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



“Respuesta vasoactiva al peróxido de hidrógeno en los anillos aislados de aorta torácica de ratas con disfunción endotelial inducido por hiperglucemia aguda, Arequipa, 2016”

AUTOR:

JIMMY ALEXANDER RAMOS CASTRO

Proyecto de Tesis para obtener el título profesional de Médico Cirujano

**AREQUIPA – PERU
2016**

I.- PREAMBULO

El estudio de la fisiopatología endotelial ha dado lugar al concepto de “disfunción endotelial”, considerada hoy en día como una alteración de la fisiología del endotelio, en cuyo centro se encuentra la hiperactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y concretamente el papel de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), que es producida por la interacción de diversos factores de riesgo o noxas y que se traduce en una serie de eventos fisiopatológicos que llevan a la alteración de la homeostasis cardiovascular.

Al considerar en la actualidad al endotelio como el órgano endocrino más grande de nuestro cuerpo, ha cambiado la visión que se tenía sobre la etiopatogenia de la hipertensión arterial por cuanto el endotelio constituye una formidable fábrica de diversos factores (15 péptidos o proteínas conocidos hasta ahora), que regulan la función circulatoria y por ende la presión arterial.

Como resultado de la hiperglucemia, se presenta un estado de estrés oxidativo que contribuye al desarrollo de aterosclerosis y al daño de órganos blanco tales como el endotelio vascular. Es por ello que su estudio y comprensión se tornan fundamentales para saber manejar la enfermedad de tal manera, se pueda mejorar y complementar su tratamiento con otro tipo de drogas tales como los antioxidantes. El desequilibrio entre los mecanismos oxidantes y la respuesta antioxidante del organismo en favor de los primeros, produce entre otros daños, las rupturas de membranas celulares así como de las que cubren las organelas del citoplasma.

Las alteraciones de la función endotelial se expresan como un compromiso de las acciones relajantes de las células musculares lisas, demostradas en diversas condiciones patológicas entre las que se cuenta a la hiperglucemia. Estos efectos ocurren ya sea por una menor producción o liberación de factores vasodilatadores o por una mayor producción o liberación de factores vasoconstrictores.

La reducción de los factores relajantes derivados del endotelio fue demostrado en vasos sanguíneos de diferentes modelos experimentales de diabetes experimental. Comprobándose inhibición de la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina y otros vasodilatadores mediados por endotelio en pacientes hiperglucémicos mientras que ello no ocurre por la acción de vasodilatadores exógenos independientes del endotelio.

En el presente estudio me propuse demostrar las alteraciones que sufre la respuesta vasodilatadora al peróxido de hidrógeno por la presencia de altas concentraciones de oxidantes en el tejido vascular resultado de la hiperglucemia aguda.



II. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿La disfunción endotelial altera el efecto vasodilatador del peróxido de hidrógeno en anillos aislados de aorta torácica de ratas con hiperglucemia?

Descripción del problema

a. Área del conocimiento:

- **Campo:** Ciencias de la Salud
- **Área:** Medicina Humana
- **Especialidad:** Fisiología y Cardiología
- **Línea:** Disfunción Endotelial y Diabetes Mellitus

b. Análisis u operacionalización de variables e indicadores:

Variable independiente: Administración a la cámara de órganos de ACh.

VARIABLE	DEFINICION	INDICADOR	ESCALA
Administración de ACh sobre anillos previamente incubados con H ₂ O ₂ .	Administración en la cámara de órganos	3 dosis de 0,1 1 y 10uM	Razón

Variable dependiente: Respuesta vasoactiva a la acetilcolina de anillos aórticos aislados.

VARIABLE	DEFINICION	INDICADOR	ESCALA
Respuesta vasoactiva a la acetilcolina de anillos aórticos aislados	Capacidad del endotelio de modular las funciones fisiológicas del lecho vascular	Porcentaje de vasodilatación de los anillos aórticos frente a la acetilcolina	Razón

c. Interrogantes básicas:

- ¿Existe disfunción endotelial en anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas con hiperglucemia aguda inducida experimentalmente?
- ¿Cuál es el efecto vasodilatador a tres dosis crecientes de acetilcolina sobre anillos aislados de aorta torácica de rata con disfunción endotelial producto de la hiperglicemia aguda inducida?
- ¿Cuál es la respuesta vasoactiva de anillos aislados de aorta torácica de ratas con hiperglucemia aguda inducida a la administración al baño de órganos aislados de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)?

d. Tipo de investigación: Experimental

e. Nivel de investigación: Experimental

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad la Diabetes Mellitus constituye un serio problema de salud pública, se calcula que en 2014 la prevalencia mundial de la diabetes fue del 9% entre los adultos mayores de 18 años (1), se calcula que en 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes (2) y según proyecciones de la OMS la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030. (3) La Federación Internacional contra la Diabetes informa que se espera que el número de diabéticos a nivel mundial aumente de 194 millones a 330 millones para 2030, y tres de cada cuatro diabéticos vivirán en países en desarrollo. La diabetes es mucho más frecuente antes de los 65 años en naciones en desarrollo, razón por la cual tendrán consecuencias mucho más graves las complicaciones microvasculares y macrovasculares. (4)

En el Perú a través del estudio “Prevalencia de Factores de Riesgo para Enfermedades no Transmisibles” (FRENT) realizado por la Dirección General de Epidemiología Vigilancia Epidemiológica de Diabetes en hospitales piloto, Enero-diciembre 2012, evidencian que la población tanto de ciudades de la Costa como de la Sierra una prevalencia alrededor del 3% (5) Así mismo entre los años 2005 y 2011, los casos registrados de diabetes mellitus por regiones naturales muestran que la Costa es la región con el mayor número de casos con un 74.5%, seguido de la Sierra con el 15.86% y la Selva con el 6.5% de casos registrados en promedio (6). Los departamentos con mayor incidencia de casos por

regiones naturales en el 2011 son: Lima con el 78% para la región Costa (incluye la Prov. Constitucional del Callao), Arequipa con un 26.1% en la región de la Sierra y Loreto con un 37.44% para la región de la Selva (6).

Diversos factores se han asociado a la aparición de la diabetes mellitus, entre ellos la herencia, la alimentación, pero dentro de la patogénesis se han relacionado otros factores que podrían estar asociados como son el hiperinsulinismo, las dislipidemias. En la actualidad se señalan y se estudian otros elementos que podrían estar involucrados como: composición de ácidos grasos, alteraciones del óxido nítrico y el estrés oxidativo, por lo que, relacionar estos elementos con la patogénesis de la diabetes mellitus y sus complicaciones sería relevante para disminuir la aparición de esta enfermedad y/o a minimizar las complicaciones crónicas de la misma. (7)

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. INTRODUCCIÓN (8)

La enorme diversidad de anomalías causadas por la deficiencia de insulina ha recibido el nombre de diabetes mellitus. Los médicos griegos y romanos utilizaron el término de “diabetes” para referirse a cuadros clínicos en que el signo cardinal era un gran volumen de orina y diferenciaron dos tipos: la “mellitus” en que la orina tenía sabor dulzón y la “insípida” en que la orina no tenía sabor. Hoy en día, el término “diabetes insípida” se reserva para entidades clínicas donde existe deficiencia de la producción o de la acción de la vasopresina y el término original, “diabetes”, suele usarse para nombrar la variedad mellitus.

La causa de la enfermedad clínica siempre es una deficiencia de los efectos de la insulina en los tejidos. La diabetes tipo 1, o insulino dependiente (IDDM), es consecuencia de la deficiencia de dicha hormona, causada por la destrucción autoinmunitaria de las células B de los islotes pancreáticos; comprende 3 a 5% de todos los casos y, por lo general, surge por primera vez en la niñez. La diabetes tipo 2, o insulino independiente (NIDDM), se caracteriza por la desregulación de la liberación de insulina por parte de las células B, junto con resistencia a dicha hormona en tejidos periféricos, como el músculo de fibra estriada, el cerebro y el hígado. Esta modalidad de diabetes suele afectar a sujetos con sobrepeso u obesos.

La diabetes se caracteriza por poliuria (expulsión de gran volumen de orina); polidipsia (ingestión de cantidades excesivas de líquidos), adelgazamiento corporal a pesar de la polifagia (mayor apetito), hiperglucemia, glucosuria, cetosis, acidosis y coma. Se advierten extensas alteraciones bioquímicas, pero las anomalías fundamentales de gran parte de ellas pueden provenir como: 1) menor penetración de glucosa en varios tejidos “periféricos”, y 2) mayor liberación de glucosa en la circulación sanguínea, por parte del hígado. Por esa razón, se advierte un exceso de glucosa extracelular y, en el interior de muchas células, deficiencia de dicho carbohidrato, situación que algunos llaman “inanición en medio de la abundancia”. Asimismo, disminuye el ingreso de aminoácidos en el músculo y aumenta la lipólisis.

2.2. Diabetes mellitus (9)

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Existen varios tipos diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética y factores ambientales. Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser deficiencia de la secreción de insulina, decremento del consumo de glucosa o aumento de la producción de ésta. El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos, y supone una pesada carga para el individuo que padece la enfermedad y para el sistema sanitario. En Estados Unidos, la DM es la primera causa de nefropatía en etapa terminal (end-stage renal disease, ESRD), de amputaciones no traumáticas de extremidades inferiores y de ceguera en adultos. También predispone a enfermedades cardiovasculares. Dado que está aumentando su incidencia en todo el mundo, seguirá siendo una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en el futuro próximo.

2.2.1 Clasificación (9)

La DM se clasifica con base en el proceso patógeno que culmina en hiperglucemia, en contraste con criterios previos como edad de inicio o tipo de tratamiento. Las dos categorías amplias de la DM se designan tipo 1 y tipo 2. Los dos tipos de diabetes son antecedidos por una fase de metabolismo anormal de glucosa, conforme evolucionan los procesos patógenos. La diabetes tipo 1 es resultado de la deficiencia completa o casi total de insulina, y la tipo 2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se caracterizan por grados variables de resistencia a la insulina, menor secreción de dicha hormona y una mayor producción de glucosa. Defectos genéticos y metabólicos diversos en la acción,

secreción o ambas funciones de la insulina originan el fenotipo común de hiperglucemia en la DM tipo 2 y tienen enormes posibilidades terapéuticas en la época actual, en que se dispone de agentes farmacológicos para corregir o modificar perturbaciones metabólicas específicas. La DM de tipo 2 es precedida por un periodo de homeostasia anormal de la glucosa clasificado como trastorno de la glucosa en ayunas (impaired fasting glucose, IFG) o trastorno de la tolerancia a la glucosa (impaired glucose tolerance, IGT).

Dos aspectos de la clasificación actual de la DM difieren de las clasificaciones previas. En primer lugar se han vuelto obsoletos los términos diabetes mellitus insulino dependiente (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) y diabetes mellitus no insulino dependiente (noninsulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM). Como muchos individuos con DM de tipo 2 acaban requiriendo tratamiento con insulina para el control de la glucemia, el empleo del término NIDDM generaba confusión considerable. Una segunda diferencia es que la edad ha dejado de emplearse como criterio en el nuevo sistema de clasificación. Aunque la DM de tipo 1 se desarrolla con más frecuencia antes de los 30 años, puede producirse un proceso de destrucción autoinmunitaria de las células beta a cualquier edad. De hecho, se estima que entre 5 y 10% de las personas que padecen DM después de los 30 años tiene DM de tipo 1. De modo similar, aunque es más típico el desarrollo de DM de tipo 2 con el paso de los años, también se da en niños, en especial en adolescentes obesos.

2.2.2 Otros Tipos de Diabetes Mellitus (9)

Otras causas de DM son defectos genéticos específicos de la secreción o acción de la insulina, alteraciones metabólicas que trastornan la secreción de insulina, trastornos mitocondriales y un sinnúmero de situaciones que alteran la tolerancia a la glucosa. La diabetes del joven de inicio en la madurez (maturity onset diabetes of the young, MODY) es un subtipo de DM que se caracteriza por ser transmitido por herencia autosómica dominante, comienzo precoz de la hiperglucemia (por lo común antes de los 25 años de edad) y trastorno de la secreción de insulina (que se tratará más adelante en este capítulo).

Las mutaciones del receptor de insulina causan un grupo de trastornos poco frecuentes caracterizados por resistencia grave a la insulina. La DM puede ser el resultado de enfermedad del páncreas exocrino cuando se destruye gran parte de los islotes pancreáticos. Las hormonas que antagonizan la acción de la insulina pueden producir DM. Por este motivo, la DM es a menudo una manifestación de ciertas endocrinopatías, como acromegalia y síndrome de Cushing. La destrucción de los islotes pancreáticos se ha atribuido a infecciones víricas, pero son una causa extremadamente rara de DM.

En Japón se ha observado una forma de diabetes de tipo 1 de comienzo agudo llamada fulminante y pudiera vincularse con una infección de los islotes de Langerhans por un virus.

2.2.3 Diabetes Gravídica (9)

Durante el embarazo se puede desarrollar y descubrir por primera vez intolerancia a la glucosa. La resistencia a la insulina relacionada con las alteraciones metabólicas del final del embarazo aumenta las necesidades de insulina y puede provocar hiperglucemia o intolerancia a la glucosa. La diabetes mellitus gravídica (gestational diabetes mellitus, GDM) se presenta en alrededor de 4% de los embarazos en Estados Unidos; la mayoría de las mujeres recuperan una tolerancia a la glucosa normal después del parto, pero tienen un riesgo sustancial (30 a 60%) de padecer diabetes en etapas posteriores de la vida.

2.2.4 Clasificación Etiológica De La Diabetes Mellitus (9)

I. Diabetes de tipo 1 (destrucción de las células beta, que habitualmente provoca déficit absoluto de insulina)

A. Inmunitaria

B. Idiopática

II. Diabetes de tipo 2 (varía entre resistencia a la insulina predominante con déficit relativo de insulina y defecto secretor de insulina predominante con resistencia a la insulina)

III. Otros tipos específicos de diabetes

A. Defectos genéticos de la función de las células beta caracterizados por mutaciones en:

1. Factor de transcripción nuclear del hepatocito (HNF) 4a (MODY 1)
2. Glucocinasa (MODY 2)
3. HNF-1a (MODY 3)
4. Factor promotor de insulina (IPF-1; MODY 4)
5. HNF-1a (MODY 5)
6. NeuroD1 (MODY 6)
7. DNA mitocondrial
8. Subunidades del canal del potasio sensible a ATP

9. Conversión de proinsulina o insulina

B. Defectos genéticos en la acción de la insulina

1. Resistencia a la insulina de tipo A
2. Leprechaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
4. Síndromes de lipodistrofia

C. Enfermedades del páncreas exocrino: pancreatitis, pancreatectomía, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa, mutaciones en el gen de lipasa de carboxil-éster.

D. Endocrinopatías: acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma.

E. Inducida por fármacos o agentes químicos: Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormona tiroidea, diazóxido, agonistas adrenérgicos beta, tiazidas, fenitoína, interferón alfa, inhibidores de proteasa, clozapina.

F. Infecciones: rubéola congénita, citomegalovirus, virus coxsackie.

G. Formas infrecuentes de diabetes inmunitaria: síndrome del "hombre rígido", anticuerpos contra el receptor de insulina.

H. Otros síndromes genéticos que a veces se asocian a diabetes: síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friedreich, corea de Huntington, síndrome de Laurence-Moon- Biedl, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader-Willi

IV. Diabetes gravídica (GDM)

2.2.5 Diagnóstico de la Diabetes Mellitus (9)

El National Diabetes Data Group y la Organización Mundial de la Salud han propuesto criterios diagnósticos para la DM basados en las siguientes premisas: 1) el espectro de la glucosa plasmática en ayunas (fasting plasma glucose, FPG) y la reacción a una carga oral de glucosa (prueba de tolerancia de glucosa ingerida [oral glucose tolerance test, OGTT]) varían entre los individuos normales, y 2) la DM se define como nivel de glucemia al que ocurren las complicaciones específicas de la diabetes más que como desviaciones a partir de una media basada en la población. Por ejemplo, la prevalencia de la retinopatía en los

amerindios estadounidenses (específicamente los pimas) empieza a incrementarse a una FPG que pasa de 6.4 mmol/L (116 mg/100 ml).

La tolerancia a la glucosa se clasifica en tres categorías, con base en la cifra de glucosa plasmática en el ayuno (FPG): 1) FPG <5.6 mmol/L (100 mg/100 ml) es la cifra normal; 2) FPG = 5.6 a 6.9 mmol/L (100 a 125 mg/100 ml) se define como prediabetes, es decir, alteración de la glucemia en el ayuno, y 3) FPG >7.0 mmol/L (126 mg/100 ml) justifica el diagnóstico de diabetes mellitus. Con base en los datos de la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) se define IGT como los niveles de glucemia entre 7.8 y 11.1 mmol/L (140 y 199 mg/100 ml) y se define la diabetes como la cifra de glucosa mayor de 11.1 mmol/L (200 mg/100 ml) 2 h después de la ingestión de 75 g de glucosa, como estímulo o carga. Algunas personas tienen la combinación de IFG e IGT. Los individuos con IFG, IGT, o ambas, cuadro llamado recientemente prediabetes por la American Diabetes Association (ADA), están expuestos a un riesgo sustancial de mostrar DM de tipo 2 (riesgo de 25 a 40% en los siguientes cinco años) y también un mayor peligro de mostrar enfermedad cardiovascular.

Los criterios actuales de diagnóstico de la DM resaltan que la FPG es el método más fiable y cómodo de diagnóstico de DM en sujetos asintomáticos. Una concentración de glucosa plasmática >11.1 mmol/L (200 mg/100 ml) tomada al azar y acompañada de los síntomas clásicos de DM (poliuria, polidipsia y pérdida de peso) basta para el diagnóstico de DM.

La prueba de sobrecarga oral de glucosa, aunque sigue siendo un método válido de diagnóstico de DM, no se recomienda como parte de la atención sistemática.

Algunos investigadores han aconsejado recurrir a la determinación de hemoglobina A1C (A1C) como prueba diagnóstica de DM. Aunque existe correlación firme entre las elevaciones de la glucosa plasmática y la A1C, las relaciones entre FPG y A1C en individuos con tolerancia normal o intolerancia ligera a la glucosa son menos claras, por lo que en la actualidad no se recomienda emplear la determinación de A1C para el diagnóstico de diabetes.

El diagnóstico de DM tiene implicaciones profundas para el individuo desde los puntos de vista médico y financiero. Por lo anterior, deben satisfacerse estos criterios diagnósticos antes de confirmar que el individuo experimenta DM. Deben persistir las anormalidades indicadoras de diabetes en estudios repetidos antes de establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad, a menos que se encuentren trastornos metabólicos agudos o

concentración plasmática de glucosa notablemente elevada. Los criterios revisados permiten, además, eliminar el diagnóstico de DM en las situaciones en las que la FPG se normaliza.

2.2.6 Patogenia De La Diabetes Mellitus De Tipo 1 (9)

La diabetes mellitus de tipo 1 es consecuencia de interacciones de factores genéticos, ambientales e inmunológicos, que culminan en la destrucción de las células beta del páncreas y la deficiencia de insulina. Dicho tipo de la enfermedad es consecuencia de destrucción autoinmunitaria de las células mencionadas, y muchas personas que la tienen (no todas) expresan manifestaciones de autoinmunidad dirigida contra islotes. Algunos sujetos que presentan el fenotipo clínico de DM de tipo 1 no tienen marcadores inmunológicos que denoten la presencia de un fenómeno autoinmunitario que afecte a las células beta. Según expertos, dichas personas terminan por mostrar deficiencia de insulina por mecanismos no inmunitarios desconocidos y fácilmente presentan cetosis; muchos de ellos son descendientes afroestadounidenses o asiáticos. Los individuos con predisposición genética tienen una masa normal de células beta en el momento del nacimiento, pero comienzan a perderla por destrucción inmunitaria a lo largo de meses o años. Se piensa que este proceso autoinmunitario es desencadenado por un estímulo infeccioso o ambiental, y que es mantenido por una molécula específica de las células beta. En la mayoría de los individuos aparecen inmunomarcadores después del suceso desencadenante pero antes de que la enfermedad se manifieste en clínica. Después empieza a declinar la masa de las células beta y se trastorna progresivamente la secreción de insulina, a pesar de mantenerse una tolerancia normal a la glucosa. La velocidad de declive de la masa de células beta es muy variable de un individuo a otro, y algunos pacientes avanzan rápidamente al cuadro clínico de diabetes, mientras en otros la evolución es más lenta. Las características de la diabetes no se hacen evidentes sino hasta que se ha destruido la mayor parte de las células beta, en este punto, todavía existen células beta residuales, pero son insuficientes para mantener la tolerancia a la glucosa. Los sucesos que desencadenan la transición entre la intolerancia a la glucosa y la diabetes franca se asocian a menudo a un aumento de las necesidades de insulina, como puede ocurrir durante las infecciones o la pubertad. Después de la presentación inicial de una DM de tipo 1, puede haber una fase de "luna de miel" durante la cual es posible controlar la glucemia con dosis bajas de insulina o incluso, en raras ocasiones, prescindiendo de ésta. Sin embargo, esta fase fugaz de producción de insulina endógena por las células beta residuales desaparece cuando el

proceso autoinmunitario termina por destruir las pocas que quedan, y el sujeto sufre un déficit completo de insulina.

2.2.7 Diabetes Mellitus tipo 1 experimental (10)

Para inducir diabetes en animales han sido usados varios métodos químicos, virales y hormonales, siendo los más utilizados los métodos químicos, los cuales destruyen total o parcialmente las células beta (β) de los islotes de Langerhans. Entre los agentes químicos más usados tenemos: estreptozotocina, ácido úrico, aloxano, N-nitrosometilurea, entre otros.

Además, también se ha utilizado la pancreatectomía asociada a alguna de estas drogas o sola. Los síntomas de diabetes humana y experimental son similares a la de los animales, ya sea ésta provocada por pancreatectomía o destrucción de los islotes de Langerhans por acción de drogas.

2.3 ENDOTELIO

El endotelio constituye un órgano grande e importante que se encuentra entre la sangre circulante y las tunicas media y adventicia de los vasos sanguíneos. Responden a los cambios en el flujo, el estiramiento, las diversas sustancias circulantes y los mediadores inflamatorios. Secretan reguladores del crecimiento y sustancias vasoactivas. (11) Desde el trabajo pionero de Furchgott y Zawadzki (12), el endotelio ha sido reconocido como el más importante regulador de la homeostasis vascular. Las células endoteliales, como unión de los vasos celulares, están estratégicamente ubicados entre las células sanguíneas circulantes y las células sanguíneas fijas, así como las células musculares vasculares. En una persona con un peso corporal de 70 Kg, el endotelio cubre un área aproximada de 700 m² y pesa alrededor de 1 a 1.5 Kg (13)

2.3.1 Estructura Del Endotelio Vascular

El endotelio hace referencia a una capa unicelular de células endoteliales que recubre vasos sanguíneos (arteriales y venosos), vasos linfáticos, cavidades cardíacas, cuerpos cavernosos y cámara anterior del ojo.

La monocapa continua que forman las células epiteliales, con la que tapizan la cara luminal interna de los vasos, es una estructura organizada que asegura su alto grado de especialización funcional. Las células endoteliales se orientan en el sentido del flujo sanguíneo.

El endotelio vascular además de constituir una barrera que separa la sangre de la pared vascular, es un órgano multifuncional. Ello hace del endotelio un sistema receptor, transductor y emisor de señales que asegura el control endo, auto y paracrino en la pared vascular.

La visión original del endotelio, como una simple barrera pasiva o aislante, ha evolucionado drásticamente hasta ser considerado un órgano multifuncional. El endotelio está situado estratégicamente para monitorizar estímulos de origen tanto sistémico como local y para modificar su propio estado funcional. Este proceso adaptativo transcurre de un modo imperceptible, contribuyendo a mantener la homeostasis. Sin embargo, pueden producirse cambios no adaptativos, provocados por estímulos fisiopatológicos, que dan lugar a alteración de las interacciones normales del endotelio con elementos celulares y macromoleculares de la sangre circulante y de la pared vascular. Estas alteraciones, conocidas genéricamente como disfunción endotelial, desempeñan un papel importante en el inicio y curso de diversas enfermedades vasculares inflamatorias y degenerativas.

Aspectos importantes en la organización endotelial con implicación en las funciones que estas células desempeñan son el hecho de que el endotelio constituye la interfase entre los compartimentos intra y extravascular, que dispone de una amplia superficie de contacto, y que presenta importantes variaciones o especializaciones regionales

La célula endotelial sintetiza, almacena y libera diferentes moléculas que cumplen funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas. El recubrimiento endotelial ostenta diferentes receptores que le permiten captar señales físicas, químicas, hormonales e inmunológicas que lo integran en el complejo psico-neuro-inmuno-endocrino del humano.

El endotelio tiene varias funciones esenciales para la salud, que se ejercen en su mayoría a través de mediadores químicos. La función más conocida del endotelio normal es la de mantener la regulación del tono de la pared vascular. El endotelio regula el tono vascular prioritariamente mediante la síntesis y liberación de prostaciclina, óxido nítrico y endotelina. Las células endoteliales constituyen una barrera selectiva que controla la permeabilidad y el transporte de solutos y macromoléculas que ayudan a metabolizar diversos factores generados localmente o aportados por la corriente sanguínea.

Además el endotelio participa en la regulación de la proliferación de las células musculares lisas subyacentes y en el control de la adhesión y extravasación de neutrófilos, monocitos y linfocitos. Todas estas propiedades son debidas a la capacidad que tiene el endotelio de actuar como sensor para los estímulos humorales y hemodinámicos.

Tres mecanismos básicos están implicados en los cambios que sufre la célula endotelial: Cambios de estructura y forma; expresión de proteínas adhesivas en la membrana celular y enzimas metabolizantes; y control de la secreción de factores derivados del endotelio.

2.3.2 Sustancias secretadas por el endotelio (14)

Las células endoteliales constituyen un tejido grande e importante. Secretan muchos factores de crecimiento y sustancias vasoactivas. Estas últimas incluyen prostaglandinas y tromboxanos, óxido nítrico y endotelinas.

2.3.2.1 Prostaciclina Y Tromboxano A2 (14)

La prostaciclina se genera en las células endoteliales y, el tromboxano A2, en las plaquetas a partir de un precursor común, el ácido araquidónico, mediante la vía de la ciclooxigenasa. El tromboxano A2 promueve la agregación plaquetaria y la vasoconstricción, en tanto la prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria y fomenta la vasodilatación. El equilibrio entre el tromboxano A2 plaquetario y la prostaciclina favorece la agregación plaquetaria localizada y la formación subsiguiente del coágulo, al tiempo que previene la extensión excesiva del coágulo y mantiene el flujo sanguíneo alrededor de éste.

El balance entre tromboxano A2 y prostaciclina puede desviarse hacia la prostaciclina con la administración de dosis bajas de ácido acetilsalicílico. Este fármaco produce inhibición irreversible de la ciclooxigenasa por acetilación de un residuo de serina en su sitio activo. Es obvio que esto disminuye la producción de tromboxano A2 y prostaciclina. Sin embargo, las células endoteliales generan nueva ciclooxigenasa en cuestión de horas, mientras las plaquetas no pueden sintetizar la enzima y el valor se eleva sólo conforme las plaquetas nuevas ingresan a la circulación.

Éste es un proceso lento porque la vida media de las plaquetas es de casi cuatro días. Por tanto, la utilización de cantidades pequeñas de ácido acetilsalicílico por periodos prolongados disminuye la formación de coágulos, y se ha demostrado que es valiosa en la prevención de infarto de miocardio, angina inestable, episodios isquémicos transitorios y apoplejía.

2.3.2.2 Óxido Nítrico (14)

Hace 20 años, una observación fortuita condujo al descubrimiento de que el endotelio tiene una función clave en la vasodilatación. Muchos estímulos diferentes actúan sobre las células endoteliales para producir factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), una sustancia conocida hoy como óxido nítrico (NO). Este último se sintetiza a partir de arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). Se han identificado tres isoformas de esta enzima: óxido nítrico sintasa 1 (NOS 1), en el sistema nervioso; óxido nítrico sintasa 2 (NOS 2), la cual se encuentra en los macrófagos y otras células inmunitarias, y óxido nítrico sintasa 3 (NOS 3), hallada en las células endoteliales. La NOS 1 y la NOS 3 se activan por medio de agentes que aumentan la concentración intracelular de calcio, incluidos los vasodilatadores acetilcolina y bradicinina. La óxido nítrico sintasa de las células inmunitarias no se activa con calcio, sino mediante citocinas. El óxido nítrico formado en el endotelio difunde a las células de músculo liso, donde activa la guanilil ciclasa soluble que produce 3,5-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), el cual a su vez media la relajación del músculo liso vascular. El óxido nítrico se desactiva con hemoglobina. La adenosina, el péptido natriurético auricular (ANP) y los receptores H2 para histamina originan relajación del músculo liso vascular, independiente del endotelio. Sin embargo, la acetilcolina, la histamina a través de los receptores H1, la bradicinina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P y algunos otros polipéptidos actúan a través del endotelio; varios vasoconstrictores cuya acción es directa sobre el músculo liso vascular, inducirían una constricción mucho mayor si sus efectos no se limitaran por su habilidad para inducir al mismo tiempo la liberación de óxido nítrico. Cuando el flujo a un tejido aumenta de manera súbita por la dilatación arteriolar, las arterias grandes que llegan al tejido también se dilatan. Esta dilatación inducida por el flujo se debe a la liberación local de óxido nítrico. Asimismo, los productos de la agregación plaquetaria propician la liberación de óxido nítrico y la vasodilatación resultante

ayuda a conservar permeables los vasos sanguíneos con endotelio intacto. Esto contrasta con los vasos sanguíneos lesionados, en los cuales el endotelio se daña en el sitio de la lesión, las plaquetas se agregan y producen vasoconstricción. Hay más pruebas de una participación fisiológica del óxido nítrico en la observación de que los ratones carentes de óxido nítrico sintasa 3 son hipertensos. Esto sugiere que la liberación tónica de óxido nítrico sintasa es necesaria para mantener la presión sanguínea normal. El óxido nítrico también participa en la remodelación vascular y la angiogénesis, y es factible su acción en la patogenia de la aterosclerosis. En este aspecto, es interesante que algunos pacientes con trasplante cardíaco generen una modalidad acelerada de aterosclerosis en los vasos del trasplante, y hay razón para creer que esto se desencadena por daño endotelial. La nitroglicerina y otros vasodilatadores muy valiosos en el tratamiento de la angina actúan mediante la estimulación de la guanilil ciclasa de la misma manera que el óxido nítrico.

La erección del pene ocurre por liberación de óxido nítrico, con la vasodilatación subsiguiente y la ingurgitación de los cuerpos cavernosos. Esto explica la eficacia de los fármacos, como el sildenafil, los cuales reducen la desintegración del monofosfato de guanosina cíclico.

2.3.2.3 Otras Funciones Del Óxido Nítrico (14)

El óxido nítrico está presente en el cerebro y, al actuar mediante el cGMP, es importante en la función cerebral. Es necesario para la actividad antimicrobiana y citotóxica de varias células inflamatorias, aunque el efecto neto del óxido nítrico en la inflamación y la lesión hística depende de la cantidad y la cinética de la liberación, lo cual a su vez es una consecuencia de la isoforma específica de óxido nítrico sintasa implicada. En el tubo digestivo, aquél es importante para la relajación del músculo liso.

2.3.2.4 Endotelinas (14)

Las células endoteliales producen endotelina-1, uno de los vasoconstrictores más potentes aislados hasta ahora. Las endotelinas1 (ET-1), 2 (ET-2) y 3 (ET-3) son integrantes de una familia de tres polipéptidos similares con 21 aminoácidos. Cada molécula está codificada en un gen distinto. La estructura única de las endotelinas se parece a la de las sarafotoxinas, polipéptidos que se encuentran en el veneno de una serpiente, el áspid israelí de madriguera.

- **Endotelina 1 (14)**

En las células endoteliales, el producto del gen para endotelina 1 se procesa hasta una prohormona de 39 aminoácidos, la endotelina 1 grande, la cual posee alrededor de 1% de la actividad de la endotelina 1. La prohormona se divide en un enlace triptófano-valina (Trp-Val) para formar endotelina 1 por acción de la enzima convertidora de endotelina. Pequeñas cantidades de endotelina 1 grande y endotelina 1 se secretan a la sangre, pero la mayor parte se libera de modo local y actúa de manera paracrina. Se han clonado dos receptores distintos para endotelina, ambos acoplados con la fosfolipasa C mediante proteínas G. El receptor ETA, específico para endotelina 1, se encuentra en muchos tejidos y media la vasoconstricción producida por endotelina 1. El receptor ETB responde a las tres endotelinas y se acopla con las proteínas G heterotriméricas inhibidoras (Gi). Es probable que participe en la vasodilatación y parece mediar los efectos de las endotelinas en el desarrollo.

- **Regulación De La Secreción (14)**

La endotelina 1 no se almacena en gránulos secretores, y la mayoría de los factores reguladores alteran la transcripción de su gen, lo cual cambia la secreción que ocurre poco después.

- **Funciones Cardiovasculares (14)**

Como se indicó antes, parece que la endotelina 1 es sobre todo un regulador paracrino del tono vascular. Sin embargo, ésta no se eleva en la hipertensión; en ratones en los que se eliminó un alelo del gen para endotelina 1, la presión sanguínea en realidad se eleva, en lugar de disminuir. No obstante, la concentración de la endotelina-1 circulante se incrementa en la insuficiencia cardíaca congestiva y después del infarto de miocardio; por ello, quizá participe en la fisiopatología de estas enfermedades.

- **Otras Funciones De Las Endotelinas (14)**

La endotelina 1 se encuentra en el cerebro y los riñones, además de las células endoteliales. La endotelina 2 se produce sobre todo en riñones e

intestino. La endotelina 3 se encuentra en la sangre y existen altas concentraciones en cerebro. Asimismo, ésta se halla en riñones y tubo digestivo. Las endotelinas son abundantes en el encéfalo y, a temprana edad, se generan en los astrocitos y las neuronas; se encuentran también en los ganglios de la raíz dorsal, las células del asta ventral, la corteza, el hipotálamo y las células cerebelares de Purkinje. También participan en la regulación del transporte a través de la barrera hematoencefálica. Se conocen receptores para endotelina en las células mesangiales, y el polipéptido tiene una función en la retroalimentación tubuloglomerular.

Los ratones con delección de ambos alelos del gen para endotelina 1 manifiestan anomalías craneofaciales graves y mueren por insuficiencia respiratoria al nacer; también tienen megacolon (enfermedad de Hirschsprung), al parecer porque las células que debieran formar el plexo mientérico no migran a la parte distal del colon. Además, las endotelinas participan en el cierre del conducto arterioso al nacer.

2.3.3 Funciones Del Endotelio Vascular

El endotelio tiene 3 funciones importantes en la regulación de la fisiología de los seres humanos sanos: el tono muscular vascular; la adhesión de leucocitos y la inflamación; y mantener el equilibrio entre la trombosis y la fibrinólisis. (15) Numerosas sustancias son importantes en el mantenimiento de la función endotelial.

La regulación del tono vasomotor en la vasculatura se determina por el equilibrio entre la relajación vascular y contracción. La sustancia más importante responsable de la relajación vascular dependiente del endotelio es el óxido nítrico (NO), o factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). El NO no sólo está implicado en la relajación del músculo liso vascular, sino también media parcialmente la inhibición de la activación de las plaquetas, la adhesión, y la agregación, la prevención de proliferación de músculo liso vascular, y la adhesión de leucocitos al endotelio. Se conocen también otras sustancias para causar la relajación dependiente del endotelio, incluyendo la prostaciclina, la bradicinina, acetilcolina, y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).

Oponerse a la relajación vascular, el endotelio también libera factores vasoconstrictores derivados del endotelio (EDCFs), cuya función principal es la de mediar la vasoconstricción dependiente del endotelio. El factor principal de vasoconstricción es la

endotelina-1, uno de los vasoconstrictores más potentes conocidos. La producción de endotelina-1 está regulada por una variedad de diversos mediadores, incluyendo la hipoxia, citoquinas, la angiotensina II, epinefrina, vasopresina, insulina, la trombina, y el LDL-colesterol. Otros dos EDCFs importantes son tromboxano A₂ y la angiotensina II. La angiotensina II se produce localmente en el endotelio a través de la conversión de angiotensina I, por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) encontrado en la superficie de las células endoteliales y sistémicamente por ACE circulante.

El endotelio también tiene un papel esencial en la regulación de la trombosis y la inflamación dentro de la vasculatura. El endotelio normal proporciona una superficie antitrombótica que inhibe la agregación de plaquetas y facilita el flujo sanguíneo. También, como se ha descrito anteriormente, el endotelio regula la trombosis a través de la liberación de NO (que inhibe la activación de las plaquetas, la adhesión, y la agregación) y otros mediadores con actividades antitrombóticas. Por último, el endotelio desempeña un papel importante en la regulación de la inflamación dentro de los vasos sanguíneos. Las propiedades anti-inflamatorias del endotelio sano son esenciales en la prevención del desarrollo de la aterosclerosis. La adhesión de los leucocitos a la superficie endotelial es importante en el desarrollo temprano de una placa aterosclerótica, y también es responsable de la ruptura de la placa y la inestabilidad que se producen más tarde en el proceso de aterogénesis. (16)

2.4 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL (17)

La disfunción endotelial está caracterizada por un desbalance en los factores de relajación y contracción derivados del endotelio. Puede ser la causa o la consecuencia de enfermedades vasculares y es conocido medianamente como marcador de factores de riesgo cardiovascular. Es interesante que la disfunción endotelial preceda las alteraciones en la estructura vascular, indicando un rol protector de endotelio intacto funcionalmente. Mientras que algunos vasos son particularmente propensos a desarrollar disfunción endotelial y aterosclerosis (arterias coronarias epicárdicas, arterias grandes, tales como la aorta o la arteria ilíaca), otros parecen ser protectores (la arteria mamaria interna, la arteria braquial).

2.4.1 Implicancia Clínica de la disfunción endotelial (17)

La evidencia experimental y clínica sugiere que la disfunción endotelial es el mayor determinante para el desarrollo y la progresión de enfermedades cardiovasculares y renovasculares. Un acierto importante de la terapia en pacientes con estas enfermedades, sería incrementar o preservar la función endotelial. La prevención o la corrección de la disfunción endotelial en la enfermedad cardiovascular con agentes dirigidos hacia el endotelio, tales como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, y estrógenos, parecen mejorar la evolución clínica de estos pacientes.

2.4.2 Potenciales Intervenciones en la Disfunción Endotelial (17)

Con el conocimiento de los mecanismos endoteliales y los métodos de diagnóstico y detección de la evolución, las intervenciones están dirigidas a las manifestaciones de disfunción endotelial más bien que a la disfunción en sí misma. Aun cuando las intervenciones dirigidas exclusivamente a la capa simple endotelial podrán ser develadas en el futuro, algunas medidas corrientemente aprovechables han dado esperanzas de mejorar la función endotelial

2.4.3 Naturaleza de la Disfunción Endotelial en la Diabetes Mellitus

La exposición a elevados niveles de glucosa puede contribuir a las anormalidades del endotelio vistas en personas con diabetes. Cuando in vitro, fueron expuestos a una aumentada concentración de glucosa, los anillos de aorta aislada normal de conejo fueron imposibles de relajar normalmente en respuesta a la acetilcolina. La reducida producción del NO parece no ser la causa de la deteriorada vasorrelajación. Un vasoconstrictor prostaglandina puede ser bastante elaborado en respuesta a la glucosa y un poco, al efecto vasodilatador normal del NO liberado por el endotelio. Los inhibidores de ciclooxigenasa restauraron la deteriorada relajación inducida con acetilcolina en las aortas de conejos normales y diabéticos expuestos in vitro a elevada glucosa. En humanos, la administración de vitamina C mejoró la vasodilatación endotelio dependiente, presumiblemente en virtud a sus efectos antioxidantes. (18)

2.5 RADICALES LIBRES

Se entiende por Radical al grupo de átomos que se comportan como una unidad, se define como Radical Libre a la especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados. Se forman por ganancia o pérdida de electrones, o por ruptura de enlaces covalentes. Este fenómeno trae consigo propiedades de atracción paramagnética con comportamiento muy reactivo, mediante acciones directas o indirectas reversibles o irreversibles, en los tejidos vivos. (19)

Son generados por reacciones bioquímicas REDOX que ocurren como consecuencia del metabolismo celular normal (reacciones bioquímicas con el oxígeno o producidas como resultado del estrés oxidativo), por los fagocitos en reacciones inflamatorias controladas, como respuesta ante la exposición a diferentes factores ambientales, entre los que figuran las radiaciones ionizantes, los rayos ultravioletas, el humo del cigarro, la contaminación ambiental, las radiaciones gamma, la hiperoxia, el exceso de ejercicio y la isquemia, así como por compuestos tóxicos tales como las drogas anticancerígenas, algunos anestésicos y analgésicos

Estas especies son muy reactivas, se comportan como verdaderos misiles biológicos, ya que no tienen receptores específicos, sino que atacan o inestabilizan todo lo que encuentran al frente, mediante acciones directas o indirectas, reversibles o irreversibles, sobre tejidos vivos, que pueden causar incluso la muerte celular.

Los radicales libres se acumulan en nuestras células provocando envejecimiento precoz y enfermedades y además, provocan la acumulación en diversos tejidos de unos pigmentos especiales llamados lipofucsina. Generalmente los componentes celulares más dañados son los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, algunas proteínas como las enzimas transportadoras de iones a través de las membranas y el ADN.

2.5.1 Concepto de oxidación y reducción

Oxidación: consiste en el proceso de pérdida de electrones por un átomo o molécula.

Reducción: consiste en ganancia de electrones por un átomo o molécula.

Agente Oxidante: es capaz de absorber electrones de la molécula a la cual oxida.

Agente Reductor: es un donador de electrones.

Agente Antioxidante: aquel que en bajas concentraciones retarda la oxidación del sustrato.

Si se añade un electrón a la molécula O_2 se formará el radical superóxido (O_2^-). Si se añade otro electrón más, se formará el ion peróxido, que propiamente no es un radical ya que no hay electrón "suelto" o no-apareado. De ahí que hoy se prefiera hablar de Especies Reactivas de Oxígeno, incluyendo entre otras al Óxido Nítrico (Factor Relajante derivado del Endotelio). (19)

2.5.2 Especies reactivas de oxígeno (20)

Desde el punto de vista fisiopatológico son de interés las siguientes especies reactivas de oxígeno:

- **(O_2^-):** Superóxido. Involucrado en procesos de autooxidación. Producido básicamente por la membrana de los neutrófilos. Otra fuente importante es la xantinaoxidasa (XO) a nivel de endotelio y cadena de transporte de electrones en la mitocondria.
- **$HO_2^{\cdot}$:** Perhidroxi. Radical libre liposoluble.
- **H_2O_2 :** Peróxido de Hidrógeno. Tóxico de mitocondrias y DNA. Ocasiona disbalance autonómico entre receptores muscarínicos (constrictores) y receptores beta (vaso relajadores), a favor de los muscarínicos.
- **$OH^{\cdot}$:** Hidroxilo es el más reactivo de todos. Acción directa sobre el DNA.
- **$RO^{\cdot}$:** (alcoxi) y $ROO^{\cdot}$ (peroxi). Involucrados en la peroxidación lipídica.
- **$HOCl$:** Acido hipocloroso. Tiene gran papel en el daño tisular directo y a distancia en el proceso de inflamación. Se combina con aminos de bajo peso molecular formando las cloraminas (los segundos tóxicos mensajeros).
- **NO :** Óxido Nítrico (FRDE=Factor Relajante Derivado del Endotelio), papel benéfico principalmente dilatador.

Donde quiera que en un organismo se produzca un desbalance entre sustancias pro oxidantes y antioxidantes con predominio de las oxidantes, resulta un proceso mórbido llamado **estrés oxidativo** en el cual se producen radicales libres.

2.5.3 Fuentes de radicales libres

Los Radicales Libres pueden ser producidos exógena y endógenamente:

- Fuentes exógenas;
 - Sustancias Reductoras
 - Oxidación de drogas
 - Tabaquismo
 - Radiación ionizante
 - Ultrasonido
 - Luz Solar
 - Shock de Calor
 - Traumatismo
 - Sustancias Oxidantes del Glutatio

Fuentes endógenas;

- Cadena de transporte de electrones
- Enzimas Oxidantes
- Células Fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos).
- Reacciones de autooxidación (20)

El organismo humano cuenta intrínsecamente con múltiples fuentes que dan origen a las especies reactivas de oxígeno. Estas especies no siempre son nocivas o patogénicas, por el contrario, son necesarias para el desarrollo de muchas reacciones complejas del metabolismo.

En este orden de ideas, se producen radicales libres a nivel de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en la cadena de transporte de electrones microsomal y a nivel de los cloroplastos; se producen además mediante la acción de diferentes enzimas

oxidantes, como por ejemplo, la xantinoxidasa, la triptofanodioxigenasa, la indolamina dioxigenasa, la galactosa oxidasa, la cicloxigenasa, lipoxigenasas y la monoaminooxidasa (MAO). Son además producidas y en escala importante por las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y monocitos, eosinófilos y células endoteliales). Otras fuentes son las reacciones de autooxidación en el organismo, como por ejemplo, la de las catecolaminas en presencia de Fe^{2+} .

En los últimos tiempos se ha encontrado evidencia que la práctica de ejercicio físico aumenta la producción de radicales libres.

2.5.4 Radicales libres en la patología cardiovascular

Los Radicales Libres tienen la capacidad de dañar, reversible o irreversiblemente, compuestos bioquímicos tales como: ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos y lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas del tejido conectivo. Estas alteraciones se manifiestan como disfunción de membrana o del metabolismo y/o en su expresión genética. El problema crucial consiste en que los radicales libres no tienen receptores específicos ni células blanco, atacan todo lo que encuentran y son verdaderos misiles biológicos. La lista de procesos patológicos en los cuales participan está en expansión día a día. En el sistema cardiovascular, la aterogénesis, los estados de isquemiareperfusión, la cardiomiopatía alcohólica, y la Enfermedad de Keshan (deficiencia de selenio) son ejemplos saltantes (21)

A continuación detallaremos el daño celular producido por las especies reactivas de oxígeno sobre diferentes macromoléculas:

A) Lípidos: Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno. (34-35)

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador.
- Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- La tensión de oxígeno.
- La presencia de hierro.
- El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión).
- La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx).

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; y una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos. (22)

- a) **Proteínas:** Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.
- b) **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, delecciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes.

El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN. (37-38)

La lista de procesos patológicos en los cuales participan está en expansión día a día. En el sistema cardiovascular, la aterogénesis, los estados de isquemia-reperusión, la cardiomiopatía alcohólica, y la Enfermedad de Keshan (deficiencia de selenio) son ejemplos saltantes.

2.5.5 RADICALES LIBRES Y ATEROGÉNESIS

Merece especial mención el proceso aterosclerótico en el cual el endotelio juega un papel preponderante en su inicio, y en donde la peroxidación lipídica de las lipoproteínas, en especial de las de baja densidad (LDL) es factor de suma importancia (36- 39). Desde el punto de vista bioquímico, la peroxidación lipídica consiste en el deterioro oxidativo de los tejidos y moléculas que contienen grasas polinsaturadas, el proceso es magnificado o acelerado por daño a nivel de membrana. La peroxidación lipídica es también observada en los estados de reoxigenación (angioplastia en la trombosis aguda y trombolisis), cambios de pH, y presencia de oxidantes y metales (40- 41).

Hasta hoy no se sabe cómo inicia la oxidación del LDL que constituye el inicio de la cascada aterogénica. Lo que se sabe es que la abstracción de un electrón a esa macro molécula lipídica es causada por un radical libre (especialmente hidroxilo) particularmente en ausencia de sustancias antioxidantes.

Se ha dicho que no existe arterosclerosis con endotelio sano. Se ha logrado demostrar que el primer evento en la aterogénesis es la pérdida de la función y arquitectura de las células endoteliales (cambiando incluso su fenotipo), en estas circunstancias el endotelio pierde el equilibrio en sus funciones endócrinas y paracrinas así como facilita el tráfico de ciertas moléculas en asociación con un aumento del espacio subendotelial.

La peroxidación de las LDL mediante los radicales libres, facilita la unión de éstas a los receptores "barredores" del macrófago iniciándose así la célula espumosa, piedra angular de proceso aterogénico. Es más, la presencia de macrófagos cargados de lípidos en la placa fibrosa conlleva a la "complicación" de la misma, al producir debilitamiento de su estructura, fisurización y/o ulceración, que en clínica se traduce en eventos isquémicos agudos tales como la muerte súbita, el infarto miocárdico y la angina inestable. (42-43)

2.6 ANTIOXIDANTES

2.6.1 Definición

Un antioxidante es aquella sustancia que en pequeñas concentraciones retarda o inhibe la oxidación de un sustrato, o que disminuye la concentración local de O_2 , que prevenga la formación de radicales libres, que ligue metales antes de la unión con el radical hidroxilo,

que actúe como "barredor" de radicales libres y finalmente, cualquier especie química capaz de romper cadenas (fenoles o aminas aromáticas). (23)

De hecho se puede definir como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de este sustrato.

El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, se debilita su acción y en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. (24) No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan a su vez reacciones con los radicales libres.

2.6.2 Clasificación

Existen numerosas clasificaciones para los antioxidantes así tenemos:

- Según el sitio donde ejerce su acción
- Según su origen

Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Clasificación de los antioxidantes según su origen

Origen	Acción
1. No enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
Coenzima Q	Transportador de electrones
Ácido Tioctico	Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)
Origen	Acción
2. Exógenos	

Vitamina E	• Neutraliza el oxígeno singlete
	• Captura radicales libres hidroxilo
	• Captura O₂
	• Neutraliza peróxidos
	• Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos	Neutraliza el oxígeno singlete
Flavonoides, Licopenos	
3. Endógenos Enzimáticos	(Todos ellos necesitan de un cofactor)
Superóxido dismutasa (SOD)	Convierte al radical libre superóxido en peróxido de hidrógeno, un radical libre menos dañino (Cobre, sodio, manganeso)
Catalasa (CAT)	Cataliza la descomposición del H ₂ O ₂ en O ₂ y H ₂ O (Hierro)
Glutación peroxidasa (GPx)	Reducir los hidroperóxidos de lípidos a sus alcoholes (Selenio)

2.6.3 Antioxidantes naturales:

Para evitar el aumento de los radicales libres en nuestro organismo que aceleran la rapidez de envejecimiento y degeneración de las células de nuestro cuerpo debemos tener la costumbre de consumir antioxidantes naturales tales como: vitamina E, vitamina C, Betacarotenos y oligoelementos.

2.6.3.1 Tocoferoles o vitaminas E (25)

- **Estructura química y función**

Los tocoferoles son lípidos isoprenoides, derivados del tocol (el 2 metil, 2- 4', 8', 12'trimetiltridecil- cromano, 6-ol). Constituyen un grupo de sustancias de estructura similar, que difieren entre sí por la posición de los sustituyentes metílicos en la molécula.

La vitamina E tiene una marcada acción antioxidante de los ácidos grasos poliinsaturados y de otros compuestos; protege a los hematíes de la acción nociva de algunos agentes oxidantes, por lo que previene la hemólisis. Experimentalmente se ha podido comprobar que evita los abortos provocados en ratas con dietas especiales.

- **Fuentes y requerimientos**

Las fuentes más importantes son los aceites vegetales, de maíz, de girasol, etc. Los aceites de pescado contienen poca vitamina E. El huevo, la lechuga, la mantequilla y los cereales también constituyen buenas fuentes.

No se han establecido dosis recomendadas para estas vitaminas; sin embargo, se ha estimado que cantidades de 10mg para los hombres y 6 mg para las mujeres cubrirían las necesidades diarias. La cantidad puede incrementarse hasta el doble durante el embarazo y la lactancia.

- **Estado carencial**

En el ser humano los síntomas de la deficiencia no se conocen bien, debido a que es raro que ésta se presente. En los recién nacidos prematuros los hematíes se hemolizan muy rápidamente, en presencia del peróxido de hidrógeno; esta hemólisis puede revertirse por la administración de la vitamina E. Se conoce el reporte de un caso con déficit de esta vitamina, provocado por la malabsorción intestinal prolongada. El paciente presentaba signos neurológicos, con alteraciones de la mielinización de los nervios periféricos.

2.6.3.2 Vitamina C (Ácido ascórbico) (26)

- **Estructura Química y función**

La estructura química de la vitamina C está relacionada con los glúcidos, ya que es un derivado del ácido L gulónico.

La sustancia pura es ópticamente activa, es soluble en agua y constituye un poderoso agente reductor. Se oxida fácilmente por la exposición al aire y en presencia de iones de Cu^{2+} o Fe^{3+} .

La función bioquímica más relevante de la vitamina C está dada por su participación en la hidroxilación de los residuos de prolina, en el proceso de síntesis del colágeno.

También parece intervenir en la absorción y reducción del hierro, en la sulfatación del colesterol y otras sustancias para su excreción, y como protectora de las vitaminas A, E y otros compuestos por su acción antioxidante. Participa, además, en algunas reacciones enzimáticas, como es el caso de la oxidación del ácido hidroxifenilpirúvico de la vía catabólica del aminoácido tirosina, aunque la enzima

no parece depender de esta vitamina, pues otros agentes reductores son igualmente efectivos. La formación de la carnitina y la extracción de hierro de la ferritina también son procesos que requieren del ácido ascórbico.

- **Fuentes y requerimientos**

Las frutas frescas y las verduras son excelentes fuentes de vitamina C, especialmente la guayaba y los frutos cítricos (naranja, uva, limón, etc.), así como los melones, los tomates y la col cruda. Estos, cuando se cocinan, pierden la vitamina.

La dosis recomendada para los adultos es de 30 mg: en los niños es de 20 mg y en las gestantes y durante los períodos de lactancia se eleva hasta 50 mg.

- **Estado carencial**

El escorbuto, enfermedad provocada por el déficit de vitamina C, se manifiesta por hemorragias superficiales, así como por trastornos de los procesos de cicatrización; los síntomas más característicos son: inflamación y sangramiento de las encías, y hemorragias puntiformes en la piel, alrededor de los folículos pilosos. Los enfermos presentan poca resistencia a las infecciones y afectación de la regeneración celular, lo que enlentece y agrava la cicatrización de heridas y quemaduras.

Diferentes investigadores han planteado que la ingestión de dosis elevadas de vitamina C es beneficiosa en el tratamiento de algunas cardiopatías, del resfriado común y de determinados tipos de cáncer entre otras enfermedades: sin embargo, esta acción curativa en la mayoría de los casos no ha sido demostrada. En cambio, sí se ha comprobado la acción antihistamínica de altas dosis de la vitamina. Por otra parte, se ha señalado que la ingestión de dosis elevadas, por períodos prolongados, puede favorecer la formación de cálculos renales, provocados por la excreción aumentada del ácido oxálico y úrico.

2.6.3.3 Retinol o vitamina A (27)

- **Estructura química y función**

La vitamina A (retinol) es un lípido isoprenoide, que contiene un anillo de ionona; la vitamina A se forma a partir de los carotenos, los cuales constituyen un tipo de pigmento vegetal; ella ejerce su acción sobre los procesos visuales, el crecimiento,

la reproducción y los epitelios. La función del retinol en la visión es conocida; lo que no está esclarecido es el modo en que la vitamina A realiza las otras funciones. La forma aldehídica de la vitamina, el 11 cis retinal, se origina por la deshidrogenación del retinol y se une a una proteína de la membrana en los bastones de la retina (la opsina) y constituye el pigmento visual (rodopsina); el 11 cis retinal se transforma por la luz en la forma todo trans (all trans). Al formarse el todo trans se provoca la hidrólisis del enlace que une el retinal a la proteína, lo cual da inicio al impulso nervioso y constituye la base bioquímica de la función de la vitamina A en la visión de la luz tenue que se genera en los bastones de la retina. Por eso es importante el adecuado aporte dietético de esta vitamina para una visión nocturna normal.

- **Fuentes y requerimientos**

Las fuentes más importantes de vitamina A la constituyen la mantequilla y la yema de huevo. Los carotenos, precursora de la vitamina, se encuentran en numerosos vegetales como la zanahoria, la calabaza y la remolacha, entre otros.

La dosis recomendada es de 1000 RE (equivalentes de retinol), como requerimiento mínimo diario; 1 RE corresponde a 1 ug de retinol o 6 pg de beta caroteno. En los niños (hasta los 12 meses) las cantidades recomendadas de esta vitamina son de 350 ug; en los adultos, de 600 a 750 ug (2 000 a 2 500 UI); y en las mujeres que se encuentran lactando, 850 ug. El almacenamiento de la vitamina A en animales bien nutridos puede asegurar las demandas de éstos durante algunos años.

- **Estado carencial**

La ceguera nocturna es un síntoma precoz de la deficiencia de vitamina A. Se presentan, además, alteraciones de la conjuntiva, la cual se engruesa y reseca, y se queratiniza (xeroftalmía); cuando este proceso se extiende a la córnea, ésta puede ulcerarse y hasta destruirse, lo cual llevaría a una pérdida irreparable de la visión.

La hipovitaminosis A también produce lesiones de hiperqueratosis en la piel. El crecimiento y desarrollo en los niños se ve afectado y pueden presentar alteraciones en el esqueleto y el sistema nervioso. Por otro lado, se ha demostrado que la

deficiencia de esta vitamina ocasiona la disminución de la formación de anticuerpos contra antígenos bacterianos.

2.6.3.4 Flavonoides (28)

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro; y flavonoide, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos; además de ser parte del árbol ginkgo biloba y la Camellia sinensis (té verde). Siendo que al consumirlos obtengamos de ellos propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. De esta última, principalmente, radica su función en el sistema nervioso, pues se ha visto relación de protección en enfermedades neurodegenerativas.

- **Estructura, clasificación y síntesis**

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6, común en la mayoría de los flavonoides. La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados.

- **Funciones antioxidantes**

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha visto que también inhiben

enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa.

Con respecto a su estructura, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición. Además, las agliconas se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos.

Conforme a lo anterior mencionado, la quercetina es el flavonoide que reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues ésta es cinco veces mayor que la de las vitaminas C y E, además de poseer una hidrosolubilidad similar a esta última. Por eso la rutina (quercetina-3-b-D-rutinósido) es, hasta el momento, el único flavonoide en presentación farmacológica (combinada) en nuestro país.

Existe efecto sinérgico con las vitaminas aludidas. Pues el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones durante más tiempo. Por su parte la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células. Donde se ha corroborado la protección antioxidante de los flavonoides en: queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad.

- **Mecanismos prooxidantes**

Debido a las características estructurales de algunos flavonoides, como las antocianidinas, provocan bajos potenciales de oxidación (EP/2), que les permite reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en un proceso de reciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, lo que explica los efectos mutagénicos y genotóxicos de algunos flavonoides.

Algunos de estos mecanismos incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la autooxidación del radical aroxilo generando anión superóxido (O_2^-) que siguiendo su secuencia general el dañino radical hidroxilo ($HO\cdot$), así como la

afección de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S-transferasa. Lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante es la estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original. Las acciones prooxidantes sólo parecen producirse cuando las dosis de los flavonoides son demasiado altas.

2.6.3.5 Oligoelementos

Los más destacados en su participación como antioxidantes exógenos (no enzimáticos) son el Selenio, Cobre, Zinc y Manganese. Su actividad reside en participar en la producción de enzimas antioxidantes.

El selenio actúa junto con la vitamina E como antioxidante, ayudando a nuestro metabolismo a luchar contra la acción de los radicales libres. Ayuda a protegernos contra el cáncer, además de mantener en buen estado las funciones hepáticas, cardíacas y reproductoras. Es el más tóxico de los minerales incluidos en nuestra dieta. La ingestión en dosis altas se manifiesta con pérdida de cabello, alteración de uñas y dientes, náuseas, vómito y aliento a leche agria. Fuentes alimentarias del selenio: Carne, pescado, cereales integrales y productos lácteos. Las verduras dependerán de la tierra en la que se ha cultivado. (29)

2.7 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las más importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS). Está implicado en multitud de procesos intracelulares tales como angiogénesis, apoptosis, la supervivencia celular, la hiperplasia, la aterosclerosis, la contracción celular y la relajación celular. En algunos de estos procesos, la función del H_2O_2 es bien conocida en otros sin embargo se desconoce su efecto.

2.7.1 Fisiología del H_2O_2 (30)

Su producción puede ser de dos tipos, de forma indirecta, a partir de la acción de la SOD sobre el anión superóxido o de forma directa, la cual tiene lugar en microsomas, peroxisomas y mitocondrias, y es la más importante en condiciones fisiológicas. En la mitocondria de la célula eucariota de un organismo aeróbico, el proceso normal de

respiración tiene como resultado final la producción de CO_2 eliminado con la espiración, y agua (H_2O), eliminada por la orina. Esta reacción final es catalizada por la enzima citocromo-oxidasa a nivel de las crestas mitocondriales. Si en lugar de esta última enzima intervienen otras oxidasas, lo cual ocurre en un pequeño porcentaje, se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en lugar de H_2O , pero a diferencia de ésta, el H_2O_2 es extremadamente inestable en presencia de metales de transición como el hierro y se descompone para formar el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), y el anión superóxido ($\text{O}_2^\cdot$). En condiciones normales de oxígeno, la producción de H_2O_2 es importante y se produce a una concentración constante entre 10^{-9} y 10^{-7}M . En el catabolismo del H_2O_2 interviene la enzima catalasa. El H_2O_2 que escapa a la acción de la enzima se elimina de forma sencilla a través de las membranas celulares.

2.7.2 Propiedades generales del peróxido de hidrógeno (31)

Cuando es pura es un líquido espeso, incoloro, de olor nitroso, de sabor metálico desagradable, soluble en alcohol y éter; su densidad es 1,46, se congela a -1° . Posee una temperatura de fusión $= -0.43^\circ$ y una temperatura de ebullición $= 150^\circ\text{C}$. Su punto de ebullición es más alto que el del agua, así que las disoluciones se pueden concentrar por evaporación. A temperatura ambiente, es un líquido azul pálido casi incoloro y viscoso (consecuencia del enlace por puentes de hidrógeno, $d = 1.44 \text{ g/cc}$). A concentraciones elevadas es extremadamente corrosiva y por tanto en esas condiciones debe ser utilizada con gran precaución. Es una sustancia más ácida que el H_2O ($K_a = 1.5 \cdot 10^{-12}$). Su formación, partiendo del agua ordinaria, es de carácter endotérmico, pues tiene lugar con absorción de calor, por lo que fácilmente se descompone en agua y oxígeno. Es una sustancia oxidante. Por la acción del calor sufre idéntica descomposición. A tres grupos se pueden referir los fenómenos que tienen lugar entre el agua oxigenada y las especies químicas:

- Ciertas sustancias en polvo fino, como el oro dividido, la esponja de platino, el dióxido de manganeso, etc, descomponen el agua oxigenada por su contacto, sin sufrir alteración. Estos fenómenos se han atribuido al aire que aquellas sustancias tienen condensado en sus poros.
- Descomposición del agua oxigenada por sustancias susceptibles de oxidarse. Por ella se pueden oxidar el selenio, arsénico, magnesio y del

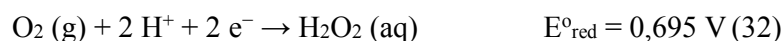
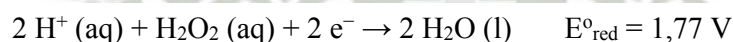
hierro, convirtiéndose los dos primeros en ácidos y en hidratos los segundos. $\text{Mg} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Mg}(\text{OH})_2$

- Descomposición de algunas sustancias de carácter oxidante en presencia del agua oxigenada a la vez que ésta.

En este caso está el óxido de plata, oro, plomo (peróxido) y de mercurio; el primero, de color pardo, pierde su oxígeno, convirtiéndose en plata reducida de color gris. El ácido crómico y el hipoclorito sódico o cálcico también se desdoblan, dando oxígeno a la vez que el agua oxigenada se descompone. Reduce al permanganato potásico y otras sustancias, sobre todo en solución ácida.

2.7.3 El Peróxido de Hidrógeno como agente oxidante y reductor

El peróxido de hidrógeno es capaz de actuar ya sea como agente oxidante o como reductor. Las ecuaciones que se muestran a continuación presentan las semirreacciones en medio ácido:



En solución básica, los potenciales correspondientes al electrodo estándar, son de 0,87 V para la reducción del peróxido de hidrógeno y de 0,08 V para su oxidación.

2.7.4 El Peróxido de Hidrogeno y Disfunción Endotelial

Los trastornos cardiovasculares se caracterizan por una respuesta anómala a vasodilatadores después de la administración de acetilcolina. Esta respuesta anormal ha sido por lo general denominado disfunción endotelial, y se considera que es uno de los principales mecanismos patogénicos responsables de la situación hemodinámica anormal de pacientes con hipertensión, diabetes o aterosclerosis. La acetilcolina induce la síntesis de óxido nítrico (NO) por las células endoteliales, y una síntesis disminuida de NO o un aumento de la inactivación de esta molécula se ha propuesto como la causa principal de la disfunción endotelial. Sin embargo, también se pueden proponer mecanismos alternativos. El NO induce relajación de las células mediante la interacción con su receptor intracelular, guanilato ciclasa soluble (sGC), que conduce a un aumento de la concentración intracelular de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Por lo tanto una reducción en el contenido de sGC o una respuesta anormal de la enzima después de su interacción con NO también podrían estar implicados en la disfunción vascular como se ha mencionado anteriormente. Algunos estudios han demostrado una disminución del contenido de sGC

en las paredes vasculares de los animales con hipertensión experimental o aterosclerosis. La deficiencia de sGC parece ser un fenómeno más general, ya que una producción de cGMP glomerular atenuada y la vasodilatación renal en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina también ha sido demostrada.

2.7.5 Propiedades físico-químicas (33)

Es un líquido incoloro bastante estable. Se comercializa como soluciones acuosas a concentraciones entre el 3 y el 90%. El contenido en H₂O₂ de dichas soluciones puede expresarse en porcentaje o en volúmenes. La expresión en volumen se refiere al contenido en oxígeno y se define como el número de veces que un determinado volumen de H₂O₂ lo contiene.

Soluble en agua y en éter; insoluble en éter de petróleo.

2.7.6 Mecanismo de acción (33)

Su acción bactericida se debe a dos motivos:

- producción de iones hidroxilo y radicales libres, que actúan oxidando componentes esenciales del microorganismo (lípidos, proteínas y DNA).
- liberación de O₂ por las catalasas tisulares, que actúa impidiendo la germinación de esporas de anaerobios como Clostridium tetani.

Además, el O₂ liberado en su descomposición en forma de burbujas favorece la eliminación de detritus celulares, bacterias y tejidos desvitalizados.

En el interior de la bacteria, por acción de la mieloperoxidasa sobre los cloruros y sobre el peróxido de hidrógeno, se forma hipoclorito (presenta poder oxidante y germicida).

2.7.7 Espectro de actividad (33)

Tiene un amplio espectro de acción. Es bactericida, bacteriostático o esporicida según la concentración y las condiciones de utilización (al 3% es bacteriostático y al 6% bactericida a temperatura ambiente). A las concentraciones utilizadas como antiséptico posee una débil acción antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Tiene una corta duración de acción porque se descompone por las catalasas tisulares, hecho que hace aconsejable su uso conjuntamente con otros antisépticos. Es efectivo frente a bacterias, hongos, algunos virus (entre ellos el HIV) y esporas. Los microorganismos anaerobios son incluso más sensibles por no disponer de actividad peroxidasa.

En general presenta mayor poder bactericida frente a Gram negativos que Gram positivos.

Frente a hongos, esporas y algunos virus su acción es un poco más lenta.

2.7.8 Indicaciones y concentraciones de uso (33)

El efecto del peróxido de hidrógeno en solución es bastante corto, por lo que no se aconseja el empleo único de agua oxigenada como antiséptico.

- **Aplicaciones como antiséptico**

- Antiséptico en el lavado de úlceras y heridas: ayuda a la eliminación de detritus tisulares en regiones inaccesibles. Se utiliza H_2O_2 de 10 volúmenes (3%) y cremas del 1%-1.5%.
- Enjuagues bucales en amigdalitis, estomatitis aguda, halitosis, extracciones dentales e infecciones de la boca. Diluir 1 parte del peróxido de hidrogeno comercial de 10 V con una parte de agua para obtener una concentración del 1.5%.
- Aunque el peróxido de hidrógeno por sí solo no es eficaz sobre la piel intacta, se emplea combinado con otros antisépticos para desinfectar manos, piel y mucosas.

Las soluciones concentradas de H_2O_2 (27% y 30%) se utilizan para preparar soluciones más diluidas y no deben aplicarse sin diluir sobre los tejidos.

- **Aplicaciones como desinfectante**

- Desinfección de lentes de contacto blandas, aparatos de ventilación asistida y tonómetros oculares a concentraciones del 3% al 6%. Antes de colocar la lente de contacto en el ojo es necesario neutralizar el peróxido de hidrógeno, ya que es irrita la córnea.
- Desinfección de aparatos para endoscopia como alternativa a glutaraldehído. A concentraciones del 6% ha mostrado incluso ser más efectiva que el glutaraldehído, pero no se utiliza porque su poder oxidante podría dañar los aparatos (deteriora gomas y plásticos de tubos de inserción). A concentraciones del 3% es eficaz frente a ooquistesde *Cryptosporidium* y se recomienda la inmersión a temperatura ambiente durante 30 minutos. Antes de utilizar los endoscopios deben aclararse a fondo porque los restos pueden lesionar las mucosas.
- Las soluciones estabilizadas del 10 al 30% se utilizan como esporicidas.

- El vapor y el plasma de peróxido de hidrógeno son utilizados como esterilizantes a bajas temperaturas. Tiene utilidad en la esterilización de equipos de laboratorio y la mayoría de artículos médicos.
- Los vapores de peróxido de hidrógeno se utilizan en cámaras como alternativa para esterilizar endoscopios, con la ventaja que no producen productos tóxicos.

El gas plasma, utilizado en esterilización, se obtiene por vaporización de peróxido de hidrógeno líquido transformado por la acción de ondas electromagnéticas. La principal ventaja es que puede aplicarse a materiales termosensibles, que no corroe los metales y que no es necesaria aireación posterior. Sin embargo, tiene escasa penetración en conductos estrechos y largos y no puede utilizarse con celulosa, textiles, polvos y líquidos.

2.7.9 Estabilidad y condiciones de uso (33)

Se degrada espontáneamente en reposo y por eso necesita incorporar agentes estabilizantes.

La descomposición gradual aumenta por acción de la luz, de la agitación y del calor.

Debe conservarse en envases aislados de la luz y del aire entre 15-30°C. Si no contiene agentes estabilizantes debe guardarse a temperatura inferior a 15°C.

Las soluciones más concentradas son más estables que las diluidas.

Las incompatibilidades también pueden provocar la descomposición. Se degrada rápidamente por la acción de álcalis y de metales finamente divididos.

2.7.10 Efectos adversos (33)

Irritación de piel y mucosas con soluciones concentradas y dermatitis de contacto.

Hipertrofia de las papilas gustativas (desaparece al dejar los lavados bucales); irritación de la mucosa bucal por el uso repetido en enjuagues bucales.

2.7.11 Precauciones de uso (33)

No administrar en cavidades cerradas por el riesgo de embolia gaseosa, ya que no puede liberarse el O₂ formado con su degradación. No debe aplicarse en los ojos. La utilización como desinfectante de lentes de contacto requiere la inactivación con piruvato, catalasas o tiosulfato de sodio. Las soluciones con concentraciones mayores al 10% pueden causar quemaduras. Daña el caucho, plásticos y metales.

3. Análisis de antecedentes investigativos

Se realizó la búsqueda en las bibliotecas de las universidades locales, no se encontró ningún trabajo investigativo previo.

DISFUNCION ENDOTELIAL ASOCIADA A LA DIABETES MELLITUS INTERACCIÓN ENTRE INFLAMACIÓN E HIPERGLUCEMIA

Palacios E., tesis para optar al título de Doctor en Farmacología y Fisiología Universidad Autónoma de Madrid.2012

Objetivo:

Analizar el papel específico que desempeñan la glucosa extracelular y una citoquina inflamatoria como la IL-1beta sobre el desarrollo de una de las alteraciones de aparición precoz de la diabetes mellitus: la disfunción endotelial

Conclusiones:

Los hallazgos indican que la hiperglucemia por sí sola no es suficiente para producir directamente disfunción endotelial, aunque puede exacerbar los efectos de una respuesta inflamatoria en curso, producida por citoquinas del tipo de la IL-1 que podrían estar mediando la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, del mismo modo que participan en distintos procesos inflamatorios relacionados con la enfermedad. El mecanismo activado por estas citoquinas puede ser la enzima NADPH-oxidasa vascular, con el consiguiente aumento en la producción de O⁻, finalmente, este trabajo sugiere que las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la vasculopatía diabética deberían no sólo disminuir la hiperglucemia, sino también reducir el ambiente pro-inflamatorio vascular. En este sentido, los antagonistas de los receptores para IL-1 constituyen una prometedora posibilidad.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y DIABETES MELLITUS

Cruz Hernández Dr, Licea Puig Dr, Hernández García Dra, Quesada Dra , Salvato Dueñas Dra, Revista Cubana de Endocrinología. 2012;23(2):166-185

Objetivo:

Describir algunos eventos implicados en la aparición de la disfunción endotelial en la diabetes mellitus, y aspectos relacionados con su diagnóstico y tratamiento.

Conclusiones:

Entre los marcadores más importantes de disfunción endotelial en la diabetes mellitus se encuentran, la elevación de las moléculas de adhesión celular y de marcadores de inflamación, la microalbuminuria, la hiperhomocisteinemia, y el incremento de la hemoglobina glucosilada, de la endotelina-1 y del estrés oxidativo. Para el diagnóstico de disfunción endotelial se utilizan la medición de sustancias reguladoras de biofunciones sintetizadas por el endotelio y de otras reconocidas como marcadores de disfunción endotelial, y pruebas indirectas, algunas de las cuales son invasivas; y para su tratamiento, disímiles medidas terapéuticas medicamentosas o no.

Es importante identificar la disfunción endotelial tempranamente en los diabéticos y tratarla, en caso de estar presente

EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO MEDIADOR EN EL PROCESO DE CONTRACCIÓN-RELAJACIÓN. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Garrido M. Tesis doctoral. Facultad De Medicina. Universidad de Alcalá.España.2007

Objetivo:

1. Estudiar la regulación del receptor de IP_3 (IP_3R) por H_2O_2 , analizándose los cambios a nivel proteico y funcional de dicho receptor en células musculares lisas incubadas con H_2O_2 , así como los mecanismos implicados.
2. Estudiar la regulación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) por H_2O_2 , analizándose los cambios a nivel proteico y funcional de dicha enzima en células musculares lisas incubadas con H_2O_2 , así como los mecanismos implicados.

3. Estudiar el papel del H_2O_2 en un modelo de hipertensión inducida por L-NAME, analizando, en ratones que sobreexpresan catalasa, la modificación de la tensión arterial, así como los cambios en la función renal y en el daño oxidativo.

Conclusiones:

1. El H_2O_2 regula dos mecanismos celulares críticos en el proceso de contracción-relajación, los sistemas de respuesta al IP_3 y al NO.
2. Esto puede tener contrapartidas funcionales importantes en situaciones que cursen con un incremento en la síntesis de H_2O_2 .
3. En el caso de la hipertensión arterial, la eliminación de H_2O_2 mediante la sobreexpresión de catalasa condicionó una menor respuesta presora en un determinado modelo de hipertensión.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Demostrar que la disfunción endotelial presente en anillos aislados de aorta torácica procedentes de ratas con hiperglucemia aguda inducida experimentalmente con estreptozotocina, altera su respuesta vasodilatadora al peróxido de hidrógeno.

Objetivos Específicos

- 1) Producir disfunción endotelial en anillos aislados de aorta torácica de ratas mediante la administración en una sola dosis de 60mg/Kg de peso de estreptozotocina en un modelo de diabetes mellitus tipo 1.
- 2) Determinar el nivel del efecto vasodilatador a tres (3) dosis crecientes de acetilcolina sobre anillos aislados de aorta torácica de rata con disfunción endotelial producto de la hiperglicemia aguda inducida.
- 3) Determinar el nivel de la respuesta vasoactiva de anillos aislados de aorta torácica de ratas con hiperglucemia aguda inducida, en la preincubación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

5. Hipótesis

La disfunción endotelial resultado del incremento de radicales libre, disminuye el efecto vasodilatador de anillos aislados de aorta torácica de ratas al peróxido de hidrógeno.

III. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Técnicas, Instrumentos y materiales de verificación

1.1 Determinación de la respuesta vascular

1.1.1 Obtención de los anillos aórticos.

Una vez sacrificados los animales mediante contusión cervical, por ser su muerte súbita y por lo tanto menos dolorosa, se les extraerá el segmento de aorta comprendido entre el arco aórtico y el diafragma. El cual será rápidamente removido y depositado sobre una placa petri que contendrá una solución salina fisiológica (K-H) a 4°C. Luego de su prolija limpieza, eliminando la adventicia, el tejido conectivo periaórtico así como el tejido adiposo dentro de la solución salina que será cambiada hasta en 3 oportunidades, se procederá a cortarla en anillos de $4,0 \pm 0,05\text{mm}$ de largo, mediante una guillotina múltiple diseñada para tal fin, extrayéndose al final 4 anillos de cada segmento.

1.1.2 Montaje de la preparación en la cámara de órganos

Uno a uno, los anillos disecados serán insertados en la cámara de órganos aislados. Para ello, se los insertará en los dos ganchos de acero inoxidable presentes en el interior de la misma cuidando que el poste fijo cubra completamente al anillo mientras que el otro, que constituye el extremo terminal del transductor de tensión isométrica se pueda desplazar sin ninguna dificultad.

Realizada la operación anterior, se llenará el pozo de la cámara con 20 ml de la solución KH la que será oxigenada mediante burbujeo continuo con una mezcla carbógena de 95% de O_2 más 5% de CO_2 . Gracias al empleo de un termociclador, que permite la circulación continua de agua por la doble pared de la cámara, se mantendrá la preparación a una

temperatura de 37 ± 0.3 grados Celsius, El proceso de estabilización se logra dejando reposar la muestra durante 30 minutos como mínimo.

Tanto las contracciones como las relajaciones inducidas en los anillos aórticos, se expresaran en porcentaje con respecto a la máxima contracción obtenida con la solución $5\mu\text{M}$ de noradrenalina (100%): La determinación del patrón de vasodilatación en condiciones fisiológicas se considerará a la respuesta obtenida con acetilcolina a la concentración de $10\mu\text{M}$.

1. Con las aortas del Grupo Control se determinará el patrón de contracción mediante el empleo de una solución de noradrenalina $5\mu\text{M}$. A la máxima contracción desarrollada frente a la misma, se considerará arbitrariamente como la máxima respuesta fisiológica (100%) del anillo aislado. Seguidamente, se determinará la respuesta normal de relajación empleando tres dosis crecientes de acetilcolina. Para ello, una vez alcanzada la estabilización de la máxima contracción se agregará con un intervalo de 5min, 0,1, 1,0 y $10\mu\text{M}$ de acetilcolina observándose la respuesta vasodilatadora. La máxima deflexión (relajación) observada con esta última dosis se la considerará como la respuesta registrada en condiciones fisiológicas la que servirá como patrón de vasodilatación para ser comparada, con las que se obtengan con los anillos de animales hiperglucémicos.
2. Uno por uno se irán disponiendo los anillos aórticos obtenidos de los diferentes grupos en la cámara de órganos aislados para determinar la magnitud de su respuesta vasodilatadora previamente contraídos con NA e incubados con peróxido de hidrógeno por 2 horas.

Inducción de hiperglucemia aguda como un modelo de diabetes mellitus tipo 1.

La inducción de hiperglucemia aguda produjo un estado diabético en ratas. Para ello, en ayunas se administró en una sola dosis vía intraperitoneal (ip) 60 mg/kg de peso de estreptozotocina (SZT), la cual fue disuelta en buffer citrato a pH 4,5 y utilizada dentro de los 10 minutos de su preparación. (10)

Instrumentos:

- Quirófano para mamíferos inferiores con mesa de disección, calefacción y lámpara.
- Equipo de órganos aislados
- Polígrafo Grass de 10 canales
- Transductor de contracción isométrica Grass
- Balanza analítica: Sartorius Verke, serie 241.
- Agitador magnético/plancha térmica marca Lab-Line
- pHmetro digital marca Meter
- Osmómetro marca Somete
- Termómetro digital marca Parmer, Serie: 08403.
- Homogenizador eléctrico marca Sonic Lab.

2. Campo de Verificación

2.1. Ubicación espacial:

El presente trabajo de Investigación se realizará en los laboratorios del Centro de Investigación de la Universidad Católica de Santa María (CICA) y Centro de Investigación y Desarrollo Científico de la Universidad Nacional de San Agustín

2.2. Ubicación temporal:

El estudio tendrá una duración de 10 semanas del 3 de Enero del 2016 al 06 de Marzo del 2016

2.3. Unidades de estudio:

La muestra Biológica estará constituida por 20 ratas albinas (Wistar) de ambos sexos con un peso corporal entre 200 a 250g de 3 meses de edad pertenecientes a la misma camada obtenidas del Bioterio de la UCSM y Centro de Desarrollo Científico.

Las unidades de estudio la constituirán anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicémicas los cuales serán distribuidos aleatoriamente según el protocolo de estudio.

2.3.1. Distribución de las unidades de estudio

Se distribuirá aleatoriamente de la siguiente manera:

2.3.1.1. **Grupo Hiperglucémico**, constituido por los anillos extraídos de 10 ratas normoglucémicas, la inducción de hiperglucemia aguda producirá un estado diabético en ratas. Para ello, en ayunas se administrará en una sola dosis vía intraperitoneal (ip) 60 mg/kg de peso de estreptozotocina (SZT), la cual se disolverá en buffer citrato a pH 4,5 y será utilizada dentro de los 10 minutos de su preparación, luego se evaluará el incremento del nivel de glucosa sanguínea durante 7 días.

2.3.1.2. **Grupo Control:** estará constituido igualmente por anillos obtenidos de 10 animales normales.

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización

Para la realización del presente proyecto se procederá de la siguiente manera:

3.1.1. Etapa pre-experimental

Se realizarán las pruebas piloto con el fin de determinar las dosis de los fármacos a utilizar así como realizar los ensayos de obtención y manejo de los anillos de aorta aislados.

3.1.2. Etapa de estandarización

Las condiciones tanto ambientales como de alimentación serán estandarizadas de tal manera, que se mantendrá a los animales en jaulas separadas a una temperatura ambiental de 24°C con humedad relativa del 30%. Pasando por períodos de luz oscuridad cada 12 horas. La alimentación será la misma, durante todo el tiempo en que dure el estudio y estará constituida por 30g de concentrado para mantenimiento marca TOMASINO® administrados a la misma hora del día y el agua ad libitum.

3.1.3. Etapa experimental

Esta se iniciará con la determinación de la respuesta vasoactiva de los anillos aórticos al peróxido de hidrógeno en la cámara de órganos aislados.

3.2. Recursos

3.2.1. Recursos humanos

Autor: Jimmy Alexander Ramos Castro

Asesor del trabajo: Dra. Noemí del Castillo Solórzano

Personal de apoyo

3.2.2. Recursos materiales

3.2.2.1. Equipos: CICA de la UCSM y Centro de Investigación y Desarrollo Científico de la Universidad Nacional de San Agustín

3.2.2.2. Reactivos y Fármacos:

Estreptozotocina

Peróxido de hidrógeno

Noradrenalina

Acetilcolina

Solución buffer Krebs/Hepes (K-H) modificado para órganos aislados, su composición en mM: NaCl, 99.01; KCl, 4.69; CaCl₂, 1.87; MgSO₄, 1.20; K₂HPO₄, 1.03; NaHCO₃, 25.0; NaHepes, 20.0, y la glucosa, 11.1, (pH 7.4).

3.2.2.3. Recursos financieros

Autofinanciado.

3.3. Criterios o estrategias para el manejo de resultados

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

Por lo que se calcularán los siguientes estadígrafos:

Medidas de tendencia central, media desviación estándar t de Students para hallar la diferencia entre dos medias independientes. Para el efecto del tratamiento se realizó el Análisis de Varianza Simple (ANDEVA). La Prueba de sensibilidad de Tukey modificada permitirá determinar la efectividad del tratamiento en el tiempo.

Las diferencias se consideraron como:

No significativas $p > 0,05$

Significativas $p < 0,05$

Altamente significativas $p < 0,01$

IV. CRONOGRAMA DE TRABAJO

Actividades	Semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Elección del tema, recopilación y revisión bibliográfica (3 al 24 Enero 2016)										
Formulación del proyecto (18 al 24 Enero 2016)										
Ejecución del proyecto (18 de Enero al 21 Febrero 2016)										
Análisis e interpretación de datos (22 de Febrero al 06 de Marzo del 2016)										
Presentación de informe final (07 al 13 de Marzo del 2016)										

V.- BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva; 2012.
2. World Health Organization. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva; 2014.
3. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med. 2006;: p. e442.
4. Braunwald E., Fauci A., Isselbacher K., Kasper D., Hauser S., Longo D., Jameson L., Loscalzo J. Aspectos mundiales de la medicina. In Harrison Principios de Medicina Interna. 17th ed. p. 13.
5. Dirección Regional de Epidemiología. Boletín Epidemiológico (Lima). [Online].; 2012 [cited 2016 Feb. Available from: <http://www.dge.gob.pe/boletines/2012/52.pdf>.
6. Ministerio de Salud - Perú. Boletín Estadístico de Salud. [Online].; 2006 [cited 2016 Feb. Available from: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/2006.pdf>.
7. Alberti K, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. Diabetic Medicine. 2007;: p. 451-63.
8. Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H. Ganong - Fisiología Médica. In.: McGraw-Hill p. 322.
9. Braunwald E., Fauci A., Isselbacher K., Kasper D., Hauser S., Longo D., Jameson L., Loscalzo J. Harrison Principios de Medicina Interna. In. p. 2275-2280.
10. García D. Influencia de la Diabetes Experimental en Respuestas Serotónicas a nivel Cardiovascular Renal. Tesis de Doctorado publicada. Universidad de Salamanca. 2005..
11. Kim E. Barret, Susan M. , Scott B., Heddwen L. Ganong Fisiología Médica. In.: McGraw-Hill; 2010.
12. Furchgott R., Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In.; 1980. p. 373-376.
13. Nathan C., Xie Q. Nitric oxidesynthases: Roles, tolls, and controls. In.; 1994. p. 915-918.
14. Kim E. , Susan M. , Scott B., Heddwen L. Ganong Fisiología Médica. In.; 2010. p. 563-566.
15. Anderson T. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. Coll Cardiol. 1999;: p. 631-638.
16. Sowinski, Kevin M. Endothelial Function and Dysfunction. Medscape. [Online].; 2000. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/408573>.
17. Sociedad de Medicina Interna de Buenos Aires. Disfunción Endotelial: Impacto en la enfermedad arterial coronaria. Revista Electrónica de SMIBA. [Online].; 1999 [cited 2016. Available from: http://smiba.org.ar/revista/smiba_03/endotelial02.htm.
18. Sociedad de Medicina Interna de Bs. As. Intervenciones Terapéuticas en la Disfunción Endotelial: El Endotelio como un órgano blanco. Revista de Medicina Interna. [Online].; 1999 [cited 2016 Febrero. Available from: http://smiba.org.ar/revista/smiba_03/endotelial09.htm.
19. Kukreja R, Hess M. The oxygen radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. Cardiovasc- Res. 1992;: p. 641-655.

20. Gamboa R. Radicales libres en la patología cardiovascular su importancia. *Revista Peruana de Cardiología*. [Online].; 1993 [cited 2016. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cardiologia/v19_n2/radical.htm.
21. Bulkley G. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*. 1993;; p. 479-483.
22. Rangon V., Bulkley G. Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury. *Br Med Bul*. 1993;; p. 700-718.
23. Davidason M. Antioxidants and lipid metabolism. Implications for the present and direction for the future. *Am-J-Cardiol*. 1993 Feb;; p. 3213-3613.
24. Halliwell B. Current status review: free radicals, reactive oxygen, species and human disease a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. 1982.
25. Cardella-Hernandez. In *Bioquímica Medica*. p. 1279-1280.
26. Cardella-Hernandez. In *Bioquímica Medica*. p. 1276.
27. Cardella-Hernandez. In *Bioquímica Medica*. p. 1277-1278.
28. Escamilla C., Cuevas E., Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009 Marzo-Abril 2; 52.
29. Instituto de Terapias Manuales. Radicales Libres. [Online]. [cited 2016. Available from: http://www.terapiasmanuales.com/v2/pub/es/articulos/5/radicales_libres/.
30. Sabán J. El endotelio sano y enfermo: Control global del riesgo cardiometabólico. In.; 2012. p. 90.
31. EcuRed: Enciclopedia colaborativa en la red cubana. Agua Oxigenada. [Online]. [cited 2016 Feb. Available from: http://www.ecured.cu/Agua_oxigenada.
32. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo. In.: Reverté p. AP28.
33. Sociedad Catalana de Farmacia Clínica. Peróxido de Hidrogeno. [Online]. [cited 2016. Available from: <http://www.scfarmclin.org/docs/higiene/part2/2392.pdf>.
34. Jerlick A., Pitt A., Schaur R., Spickett C. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med*. 2000;; p. 673-682.
35. Reyli P., Burkley G. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg*. 1990;; p. 1324-1325.
36. Walidius G., Regnstrom J., Nilsson J., Johansson J., Schafer Elinder L., Moelgaard J., Hadell K., Olsson A, Carison. The role of lipids and antioxidative factors for development of atherosclerosis. The Probucol Quantitative Regression Swedish (PORST). *Am-J-Cardiol*. 1993;; p. 15B-19B.
37. Roche E. In *Estrés oxidativo y degradación de proteínas*.; 1994. p. 189-196.
38. Oteiza P. In *Modificación oxidativa de proteínas. Antioxidantes y calidad de vida*.; 1995. p. 12-20.
39. Bankson D., Kestin M., Rifai W. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin-Lab-Med*. 1993;; p. 463-480.
40. Darley-Usmar V, Hogg N, O'Leary V, Wilson M, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. .
41. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith W, Dargie H. Evidence for oxidative stress in unstable angina. *Br-Heart-J*. 1992 November;; p. 454-457.
42. De Forge L, Fantone J, Kenney J, Remick D. Plasma lipid peroxidation, activity of erythrocyte superoxide dismutase. *J Clin-Invest*. 1992 Nov;; p. 2123-2129.

43. Sun J, Kaur H, Halliwell B, Li X, Bolli R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo. Direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. *Circ-Res.* 1993;; p. 534-549.



ANEXO 01

Ficha de recolección de datos

GRUPO	RAT A N°	Constricción con Noradrenalina 5uM (%)	Dilatación con Acetilcolina 0.1uM (%)	Dilatación con Acetilcolina 1u M (%)	Dilatación con Acetilcolina 10u M (%)	Respuesta Vasodilata dora al H ₂ O ₂ 10 ⁻⁴ M (%)
Control	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
Hipergli cemico	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					