



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**MODULACIÓN ENDOTELIAL DE LA
CONTRACCIÓN VASCULAR DURANTE LA
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

TESIS QUE PRESENTA
FELIPE FRANCISCO RIVERA JARDÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA
EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ASESORES DE TESIS:

**D.C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ
M.C. HÉCTOR URQUIZA MARÍN**

MORELIA MICHOACÁN, OCTUBRE DE 2007



AGRADECIMIENTOS

M.C. HÉCTOR URQUIZA MARÍN
D.C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ
M.C. PATRICIA CASTRO MORENO

En reconocimiento a las facilidades y todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo de tesis, y con la promesa de seguir siempre adelante, dedico la presente como muestra de agradecimiento y gratitud.

Doy infinitas gracias...
A Dios, por el camino recorrido....
A mis padres, por ser mi fuerza y templanza...
A mi familia, por creer en mi...
A mis amigos y amigas... fieles y sinceros...
A la vida.... por lo aprendido y lo que sigue...

DEDICATORIA:

A mis padres, quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

Por esto y más... Gracias.

ÍNDICE

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1. DIABETES MELLITUS.....	10
a) DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN.....	10
b) DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1).....	10
c) DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2).....	11
1.2 METABOLISMO DE GLUCOSA Y PARTICIPACIÓN DE INSULINA DURANTE DM.....	12
1.3 PERSPECTIVA ACTUAL DE LA DIABETES MELLITUS.....	15
1.4 COMPLICACIONES QUE GENERA LA DIABETES MELLITUS.....	15
1.5 ALTERACIONES EN LOS VASOS SANGUÍNEOS DURANTE LA DIABETES MELLITUS.....	19
1.6 EL ENDOTELIO COMO REGULADOR DEL TONO VASCULAR.....	20
I) PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL TONO VASCULAR.....	23
a) BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.....	
b) SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL.....	23
c) GUANILATO CICLASA Y GMPc.....	23
d) LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.....	24
a) BIOSÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS.....	28

1.7 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	30
1.8. JUSTIFICACIÓN.....	30
1.9. HIPÓTESIS.....	30
1.10. OBJETIVOS.....	30
1.11 OBJETIVO GENERAL.....	32
1.12 OBJETIVOS PARTICULARES.....	

CAPITULO 2 METODOLOGÍA

2.1. DESARROLLO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES MELLITUS	36
2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	38
2.3. REACTIVOS.....	39
2.4. PREPARACIÓN DEL TEJIDO.....	40
2.5. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA.....	40

CAPITULO 3 RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
---	-----------

CAPITULO 4 DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN.....	45
---------------------------	-----------

CAPITULO 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES.....	48
5.2. PERSPECTIVAS.....	48
5.3. BIBLIOGRAFÍA.....	49

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 DIABETES MELLITUS

a) DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN.

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de desordenes metabólicos, caracterizados por hiperglucemia que resulta de los defectos en la secreción de insulina, en su acción ó en ambos. Durante la DM se altera principalmente el metabolismo de carbohidratos (glucosa), proteínas y grasas. La diabetes mellitus se caracteriza porque presenta síntomas como: polifagia (aumento de apetito), poliuria (exceso en la eliminación de orina), polidipsia (aumento en la sensación de sed), pérdida de peso y visión borrosa, todos ellos, son el resultado de la hiperglucemia persistente. La hiperglucemia crónica de la DM está asociada con daño, disfunción ó fallo, a largo plazo de varios órganos especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos (Lermori R.H 2003). Las alteraciones del sistema inmune durante esta enfermedad favorecen infecciones mucocutáneas (bacterianas, micóticas) acompañadas por picazón ó prurito (Best ð Taylor 2003), y al mismo tiempo presenta un aumento del riesgo de complicaciones por enfermedad vascular (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus; Davis S. N. Y Granner D. K., 2003). Para esta enfermedad de tipo crónica, aún no existe cura, y las formas más comunes de esta enfermedad incluyen:

b) DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1):

Este tipo de diabetes es de mediación inmunitaria en más de 90% de los casos, e idiopática en menos de 10% (MASHARANI U. 2006). Caracterizada por una

destrucción de las células β de los islotes pancreáticos, deficiencia absoluta de secreción de insulina y tendencia a la cetoacidosis. En este tipo de diabetes, la disfunción endotelial se mantiene y puede causar microangiopatía diabética, no obstante, aún no está claro si la disfunción endotelial es una característica del estado diabético por sí mismo (Schalkwijk, 2005).

En los pacientes con DM1 que tienen de 5 a 10 años con la enfermedad presentan un incremento ligero de la presión sanguínea, rigidez en las arterias, aún así cuando la excreción urinaria de albúmina sea normal (Schalkwijk, 2005).

c) DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2):

Este tipo de diabetes constituye un grupo heterogéneo de variantes leves que se presentan de manera predominante en los adultos y hay un considerable aumento en niños y adolescentes (MASHARANI U. 2006; Kaufman, 2002; Winer y Sowers, 2004), y se caracteriza además por resistencia a la insulina y deficiencia (no absoluta) en la secreción de ella. La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes, son obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, presentan una fuerte predisposición genética y los niveles de insulina plasmática son normales o elevados sin tendencia a la acidosis. Con dieta adecuada e hipoglucemiantes orales como tratamiento se puede mantener niveles plasmáticos normales de glucosa, aunque muchos diabéticos, con el tiempo, requieren de insulina para su control. Sin embargo, la administración de insulina no es indispensable para controlar los niveles normales de glucosa sanguíneos. Existen datos de una alta prevalencia de pacientes con DM2 y cabe mencionar que hay un número

aproximado de pacientes no diagnosticados, con una subestimación de 90%, es decir, por cada paciente diagnosticado hay 9 que aún no lo saben (Diamond 2003; Zimmet et-al 2001). Este tipo de DM conduce a una enorme cantidad de complicaciones en todo el organismo por ejemplo Shalkwijk y colaboradores en el 2005 reportaron en un estudio en pacientes con DM2 que la excreción urinaria de albúmina aumenta con la disfunción endotelial, y en paralelo, ambas progresan con el tiempo. (Shalkwijk et-al 2005)

1.2 METABOLISMO DE GLUCOSA Y PARTICIPACIÓN DE INSULINA DURANTE DM

El páncreas es la pieza clave en la secreción de insulina y esta a su vez participa en el metabolismo de la glucosa. Este órgano de carácter exócrino, presenta células hacinadas; que secretan enzimas digestivas, y células en forma de islote; que tienen función sobre el metabolismo.

El islote de Langerhans está compuesto de cuatro tipos de células, cada una de las cuales sintetiza y secreta una hormona polipeptídica distinta: la insulina se sintetiza en la célula β (B) la cual abarca 60-80% del islote, el glucagon en la célula α (A), la somatostatina, en la célula δ (D), y el polipéptido pancreático en la célula PP ó F (Davis S. N. Y Granner D. K, 2003).

En los humanos, los carbohidratos representan una fuente importante de energía para las células de los diversos tejidos (cerebro, sistema nervioso central, músculo), por lo que la glucemia debe mantenerse dentro en un límite estrecho, con valores normales de 70-110 mg/dl en sangre venosa, para esto interviene la interacción de diversas hormonas, el sistema nervioso autónomo y los tejidos blanco, habiendo captación y liberación de glucosa. (Arias P. 2003).

La elevación de glucosa en sangre que se produce inmediatamente después de una comida rica en hidratos de carbono, estimula la secreción de insulina y suprime la secreción de glucagon (Mathews et-al, 2003). Así, la insulina torna su papel hipoglucemiante, antilipolítico y anabólico proteico, permitiendo controlar la captación, utilización y el almacenamiento de esta glucosa y algunos otros nutrientes celulares (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003; Arias P. 2003). Posteriormente, se promueve la captación de glucosa por el hígado, se estimula síntesis de glucógeno y se suprime la degradación del mismo.

La enzima glucocinasa, encargada de fosforilar a la glucosa, comienza una serie de reacciones enzimáticas para degradar los azúcares y producir la energía que requiere la célula. Cuando hay muchos azúcares almacenados en el hígado, la acetil-CoA carboxilasa, enzima presente en los adipocitos, ejerce su acción sintetizando cadenas largas de ácidos grasos y triglicéridos.

Las acciones anabólicas de la insulina incluyen la estimulación del uso y almacenamiento intracelulares de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, en tanto que bloquea procesos catabólicos, como la desintegración de glucógeno, grasa y proteína (Davis S. N. Y Granner D. K. 2003). La falta total de insulina es incompatible con la vida (Arias P. 2003).

La insulina estimula la utilización de los hidratos de carbono, desplazando los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática, de manera que puede producirse con mayor facilidad la captación de glucosa en las células para el catabolismo ó para la síntesis de glucógeno (Mathews, 2003).

La glucosa entra en la célula β mediante transporte facilitado, que está mediado por GLUT2 (transportador de glucosa), a continuación, la glucocinasa lleva a cabo la fosforilación del azúcar (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003).

La participación de la glucocinasa como el detector de glucosa, se tornó más sólido por la relación reciente entre mutaciones del gen que codifica para la glucocinasa y la diabetes del joven de inicio en la madurez (MODY2); una forma relativamente poco frecuente de diabetes (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003).

La insulina tiene una vida media en plasma de 5 a 6 minutos en sujetos normales y en pacientes con diabetes mellitus no complicada se desintegra en hígado, riñones y músculo. (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003).

Varias horas después de la ingestión de comida, las concentraciones de glucosa empiezan a caer, los procesos antes mencionados se invierten; la secreción de insulina se hace más lenta y la secreción de glucagón aumenta (Mathews, 2003), pero en la diabetes los niveles de glucosa no decaen y persisten en la circulación sanguínea. Cuando hay niveles bajos de insulina en sangre, se reduce la captación de glucosa por el músculo, el hígado y el tejido adiposo, así la glucosa hepática se exporta a la sangre y puede utilizarse por el cerebro.

Una manera de explicar el porqué el hígado produce glucosa en exceso en el estado de resistencia a insulina característico de la diabetes tipo 2, es que la insulina bloquea la gluconeogénesis a través de la transcripción de fosfoenolpiruvato carboxicinas. Aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual se logran estas acciones (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003).

1.3 PERSPECTIVA ACTUAL DE LA DIABETES MELLITUS

En México, la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en adultos mayores de 20 años de edad, aumentó de 6.7% en el año 1993 a 7.5% en el año 2000, y se calcula que podrá tener un alza 12.3% (11.7 millones) para el 2025 (Tabla 1; ENSA 2000).

La población mexicana tiene una predisposición genética al síndrome metabólico (obesidad, diabetes e hipertensión), a la diabetes mellitus tipo 2 y a varios tipos de dislipidemias. La ingesta de dietas ricas en grasas y carbohidratos refinados, el consumo de tabaco y de alcohol además de un estilo de vida sedentario en una gran proporción de la población mexicana, han sido identificados como factores ambientales para el desarrollo de algunas enfermedades crónicas como la hipertensión y la diabetes mellitus (ENSA 2000).

1.4 COMPLICACIONES QUE GENERA LA DIABETES MELLITUS

La DM tiene un progreso silencioso, comúnmente en un inicio esta enfermedad es asintomática y cursa inadvertida. En muchas ocasiones, cuando al paciente se le diagnostica este padecimiento es porque ya ha aparecido alguna complicación debido al aumento de glucosa en sangre.

Casi todas las formas de diabetes se deben a deficiencia y resistencia a la insulina (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003). Esa anomalía conduce a alteraciones del metabolismo de carbohidratos, lípidos, cetonas y aminoácidos, la característica central del síndrome es la hiperglucemia, que trae consigo una

deshidratación importante y los consecuentes síntomas de polidipsia que a su vez conduce a la poliuria.

Tabla 1. Tasa de morbilidad de nuevos casos de las enfermedades más comunes, 2000-2004.

(Por 100 mil habitantes) Causa de casos nuevos de enfermedad	2000	2001	2002	2003	2004
Infecciones respiratorias agudas	29 427.3	27 980.5	28 874.3	25 948.9	24 581.3
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	5 203.3	5 283.3	5 250.2	4 684.0	4 535.5
Infección de vías urinarias	2 967.1	3 240.5	3 276.0	3 154.2	3 228.2
Úlceras, gastritis y duodenitis	1 284.1	1 393.5	1 413.6	1 281.7	1 365.7
Amebiasis intestinal	1 353.4	1 237.8	1 124.8	972.6	792.2
Otitis media aguda	614.6	643.2	693.9	695.6	675.3
Hipertensión arterial	401.4	407.8	418.8	478.2	529.8
Otras helmintiasis	735.2	646.5	580.6	524.4	498.0
Diabetes mellitus (Tipo II)	287.2	291.3	308.6	365.0	384.0
Varicela	377.1	235.5	282.7	307.0	365.8
Gingivitis y enfermedad periodontal	ND	ND	ND	276.0	350.0
Candidiasis urogenital	302.5	325.8	354.8	346.3	330.9
Asma y estado asmático	261.0	275.2	274.6	289.1	289.5
Intoxicación por picadura de alacrán	ND	221.7	231.7	233.4	218.5
Faringitis y amigdalitis estreptocócicas	ND	ND	ND	573.9	201.7
NOTA: Con base en el último año se consideran los quince principales casos nuevos de enfermedades. ND No disponible. FUENTE: SSA. SUIVE. Dirección General de Epidemiología. www.dgepi.salud.gob.mx (24 de febrero del 2006).					

www.dgepi.salud.gob.mx.

Las complicaciones que esta enfermedad puede provocar en algunos adultos, es daño a diversos órganos que conducen a daño en los ojos (retinopatía), sistema nervioso (neuropatía) y riñones (nefropatía), generando un incremento en el costo de la atención médica de esta enfermedad. De igual manera los sujetos con diabetes mellitus tipo 2, tienen un incremento de 2 a 4 veces el riesgo de morir por enfermedades cardiovasculares (ENSA 2000).

La amplia duración de la DM está asociada a complicaciones que llegan a ser un considerable problema de salud pública. La hiperglucemia es la causa inicial del daño a tejidos, así como determinantes genéticas ó la susceptibilidad individual que conducen a dichos daños. El deterioro de los tejidos por la hiperglucemia se presenta en subgrupos de tipos específicos de células como: células endoteliales de retina, células mesaginales del glomérulo renal, en neuronas y en nervios periféricos.

Se estima que 14% de los diabéticos desarrolla insuficiencia renal crónica, 10% neuropatía motriz, sensitiva y autonómica, 10% pie diabético (1/3 de los cuales terminará en amputación) y 2-5% ceguera. En los diabéticos, la alteración en el metabolismo de lípidos genera hipertensión, aterosclerosis y dislipidemia, lo cual eleva la incidencia de cardiopatías y vasculopatías (Hernández y Olaíz, 2002). De estas últimas, las enfermedades vasculares tienen la mayor problemática de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes mellitus (Schalkwijk y Stehouwer, 2005).

Los adultos con DM tienen un riesgo de 2 a 4 veces mayor de eventos cardiovasculares relativos a los que no tienen diabetes (Fox et al., 2004). Las enfermedades cardiovasculares se presentan arriba del 80% en pacientes diabéticos y conducen a mortalidad prematura (Winer y Sowers, 2004).

Dentro de las complicaciones de la DM y la que es de interés en este trabajo es aquella que implica enfermedades vasculares. Dentro de estas complicaciones se encuentran las enfermedades microvasculares y macrovasculares (Davis S. N. Y Granner D. K., 2003). Estas complicaciones conducen a incapacidad y deterioro en la calidad de vida en pacientes con DM.

La DM en humanos se ha asociado con hiperreactividad del músculo liso vascular, y muchos reportes lo han atribuido a un sin fin de posibles causas, como es el caso Agrawal, que menciona que el aumento en la respuesta contráctil en arterias de ratas diabéticas puede ser por una mayor actividad de los canales de calcio en células de músculo liso vascular (Agrawal y McNeill, 1987), de otra forma, puede deberse a una alteración de la distribución del Ca^{+2} subcelular, o por un aumento de anión superóxido O_2^- (Fleischhacker et al., 1999), aunque estas alteraciones también pueden estar asociadas a la gran producción de factores angiogénicos y citocinas por parte del hígado y que conducen al desarrollo de aterosclerosis, pues en hígado de pacientes diabéticos se han encontrado genes sobre regulados que codifican para factores angiogénicos, endotelina, citocinas y factores de crecimiento derivados de plaquetas, así como proteínas morfogénicas de hueso (Takamura et al., 2004). De otra manera también se han atribuido alteraciones en la función endotelial, cuando este carece de la capacidad para liberar agentes vasodilatadores (Schalkwijk y Stehouwer, 2005).

También se ha publicado que la función alterada del músculo liso vascular, es debida a la reducción en el efecto contráctil debido a la liberación de prostaglandinas vasoconstrictoras derivadas de células endoteliales (Carvalho Leone y Coelho, 2004).

La secuelas de la hiperglicemia crónica durante la diabetes de todos los fenotipos son divididos dentro de dos complicaciones, Microvasculares y Macrovasculares. (Hammes, 2003)

COMPLICACIONES MACROVASCULARES:

Aterosclerosis Coronaria acelerada

Aterosclerosis cerebrovascular acelerada

Enfermedad vascular de extremidades inferiores acelerada

COMPLICACIONES MICROVASCULARES

Retinopatía

Nefropatía

Neuropatía

1.5 ALTERACIONES EN LOS VASOS SANGUÍNEOS DURANTE LA DIABETES MELLITUS

Las enfermedades cardiovasculares representan el 50% de las causas de muerte en adultos mayores en sociedades de todo el mundo y la mayoría son atribuibles al daño endotelial. Por ello, el conocimiento de la anatomía de la pared vascular es esencial para comprender la fisiopatología de la aterosclerosis, el vasoespasmo, la hipertensión arterial y pulmonar, el shock séptico, las enfermedades autoinmunes, el crecimiento tumoral, todas las complicaciones durante la diabetes mellitus, etc. (Arias P. 2003).

La anatomía básica de los vasos sanguíneos está compuesta por tres constituyentes básicos: tejido conjuntivo, músculo liso y endotelio.

La capa más externa de los vasos (tejido conjuntivo), es la adventicia que está formada por una red laxa de haces de colágena, fibras elásticas, células lisas y fibroblastos. (Harrison; 2001). La túnica media (músculo liso) consta de las células musculares lisas dispuestas en una sola capa (arterias musculares pequeñas) ó en múltiples capas (arterias elásticas). La túnica está rodeada en el lado luminal por la lámina elástica interna y externamente, por una capa menos continua de tejido elástico, la lámina elástica externa (Harrison; 2001). Algunos vasos de gran diámetro como la aorta contienen

cantidades relativamente grandes de tejido elástico (Figura 1; Ganong, W. F.; 2000).

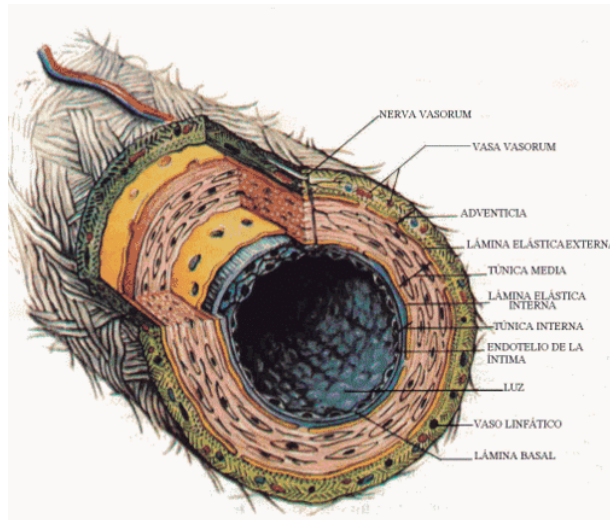


Figura 1. Estructura de los vasos sanguíneos.

La superficie luminal (endotelio) de los vasos sanguíneos está constituida por una capa continua de células endoteliales. El endotelio tapiza todos los vasos del organismo y es la estructura más importante para la comunicación entre el flujo sanguíneo y la pared vascular (Lermori R.H 2003). El endotelio intacto es una de las condiciones más importantes para modular la vasoconstricción que se presenta en síndromes isquémicos agudos; probablemente la mayoría de las enfermedades cardiovasculares refleja un cierto grado de disfunción endotelial (Lermori R.H 2003; Schalkwijk, 2005).

1.6 EL ENDOTELIO COMO REGULADOR DEL TONO VASCULAR

En los últimos 20 años las investigaciones realizadas evidencian que el endotelio vascular no es sólo una barrera entre los compartimentos

intravascular e intersticial. De hecho, el endotelio vascular es un órgano responsable de la regulación de procesos hemodinámicos, metabólicos, sintéticos, inflamatorios, antitrombogénicos, protrombogénicos y de remodelado vascular (Goligorsky et al., 2001).

En el pasado, se consideró al endotelio como una simple monocapa de células cuya función era evitar el desgaste del músculo liso vascular debido a la fricción originada por cambios en el flujo sanguíneo. En la actualidad, el endotelio vascular se define como un sistema dinámico que puede influir profundamente en la fisiología del músculo liso vascular y en la fluidez de la sangre. La influencia del endotelio en el control de la circulación se hizo evidente cuando se descubrió su capacidad de producir sustancias vasoactivas y con efectos sobre plaquetas y otros elementos formes de la sangre (Furchgott, 1983; Gryglewski et al., 1988).

La primera observación fue la reportada por Furchgott en 1980, quien encontró que la respuesta a acetilcolina (ACh) de anillos aislados de aorta torácica de conejo era diferente en presencia y en ausencia de endotelio. Él observó relajación a la ACh, dependiente de la concentración, en arterias con endotelio y respuesta nula en ausencia de endotelio. Esto dió origen a la hipótesis de que el endotelio liberaba una sustancia responsable de la relajación inducida por ACh a la cual llamaron Factor Relajante Derivado del Endotelio (Furchgott et al., 1980).

Observaciones posteriores demostraron que además de la Ach, el tono vascular es susceptible de ser modificado por una gran variedad de sustancias endógenas que producen relajación únicamente en presencia del endotelio, a

estas sustancias se les denominó “vasodilatadores dependientes del endotelio” (Furchgott et al., 1984).

La identidad del factor relajante derivado del endotelio se demostró al encontrar que la relajación presentada por tiras de aorta de conejo era dependiente de la cantidad de óxido nítrico presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Además, se observó que las acciones biológicas del factor relajante derivado del endotelio descrito por Furchgott no eran diferentes de las producidas por el óxido nítrico (Ignarro et al., 1987; Moncada et al., 1988).

De manera adicional, el endotelio vascular tiene un papel fisiológico importante en el control local de la circulación, mediante la producción de factores relajantes (óxido nítrico, factor hiperpolarizante derivado del endotelio y prostaglandina I₂) y factores contráctiles (endotelinas, angiotensina II, aniones superóxido, tromboxano A₂, prostaglandina H₂ y otros metabolitos del ácido araquidónico; Lüscher et al., 1991; 1993). Estos mediadores químicos se liberan por las células endoteliales en condiciones basales o cuando se estimulan por factores físicos y sustancias vasoactivas (Moncada et al., 1991; Lüscher et al., 1993) tales como noradrenalina (liberada de las terminales nerviosas) o serotonina (liberada por las plaquetas) en estados fisiológicos o patológicos (Dohi et al., 1996).

Adicionalmente, el endotelio ejerce una influencia reguladora profunda sobre la arquitectura vascular y las interacciones de la pared vascular con las células sanguíneas, ya que algunos de los factores endoteliales mencionados cuentan con actividad antiproliferativa y trombolítica. Por otro lado, el endotelio

vascular puede sufrir disfunción, insuficiencia y daño. A estas alteraciones se les conoce como síndrome de disfunción endotelial (Goligorsky et al., 2001).

I) PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL TONO VASCULAR.

a) BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico se sintetiza por una de las dos vías descritas hasta la fecha para el aminoácido L-arginina, a través de un grupo de enzimas conocidas como sintasas de óxido nítrico (NOS). Este grupo está integrado por tres isoformas; la endotelial (eNOS o NOS III), la inducible (iNOS o NOS II) y la neuronal (nNOS o NOS I). Estas enzimas catalizan la oxidación sucesiva de alguno de los dos residuos amino guanidino de la L-arginina para formar dos intermediarios inestables, la N^G-hidroxi-L-arginina y posteriormente la N^G-oxo-L-arginina de mayor estado de oxidación. De esta última se libera óxido nítrico y L-citrulina, por un reacomodo intramolecular (Moncada et al., 1989; Figura 2, Jonhs et al., 1997).

b) SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL.

En condiciones fisiológicas normales, la eNOS es la única isoforma expresada en las células endoteliales. Esta enzima se localiza de manera constitutiva en la cara interna de la membrana celular, su activación es dependiente de calcio-calmodulina y es la responsable de producir óxido nítrico de manera basal y como respuesta compensatoria a estímulos vasoconstrictores (Wang et al., 1995).

c) GUANILATO CICLASA Y GMPc.

Después de su síntesis, la primera función biológica del óxido nítrico es la activación de la guanilato ciclasa soluble para incrementar el contenido de GMPc en varios tejidos, incluyendo el músculo liso vascular y el cerebro (Holzmann, 1982; Rapoport y Murad, 1983). La activación se realiza por la unión del óxido nítrico al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, que provoca un movimiento del grupo hemo de la proteína y un cambio conformacional que incrementa su actividad catalítica (Schmidt et al., 1993). El GMPc es un segundo mensajero a través del cual se llevan a cabo muchas de las funciones del óxido nítrico, como la relajación de los vasos sanguíneos, inhibición de la agregación plaquetaria y la proliferación de las células del músculo liso vascular (Moncada et al., 1991). Se conocen dos isoformas de la guanilato ciclasa, la particulada (unida a la membrana) y la soluble (citosólica). La soluble es activada por el óxido nítrico, mientras que la particulada sólo se activa por péptidos atrial-natriuréticos (Jonhs, 1997).

d) LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.

La estimulación de receptores endoteliales por neurotransmisores ó cotransmisores (noradrenalina, acetilcolina, substancia P y ATP), por autacoides (adenosina, trombina, bradicinina, angiotensina II, histamina, serotonina y endotelina) ó por hormonas (insulina, oxitocina, vasopresina y estrógenos) producen la liberación de óxido nítrico (Moncada et al., 1991; Lüscher et al., 1993).

La generación de óxido nítrico también se incrementa por factores físicos como el flujo sanguíneo o la contracción de los vasos sanguíneos. De esta

manera el óxido nítrico tiene una función destacada en la regulación del tono del músculo liso vascular y del flujo sanguíneo hacia los tejidos.

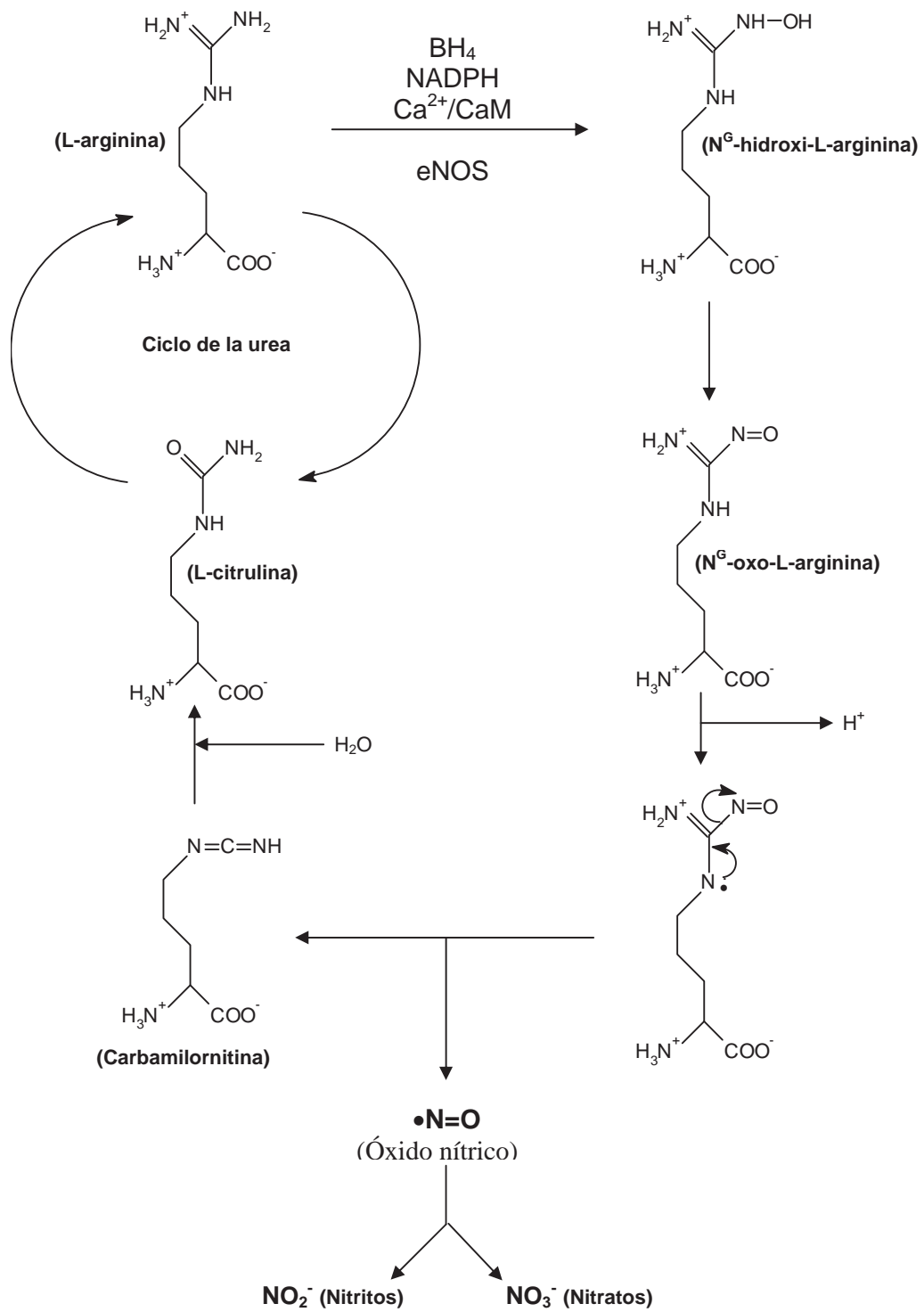


Figura 2. Biosíntesis del óxido nítrico.

II) LAS PROSTAGLANDINAS COMO MODULADORES DEL TONO VASCULAR.

Casi cualquier tejido del organismo contiene cantidades pequeñas a moderadas de varias sustancias, relacionadas químicamente, denominadas prostaglandinas. Estas sustancias tienen efectos intracelulares importantes. Además, algunas se liberan a los líquidos tisulares locales y a la sangre circulante, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Aunque algunas de las prostaglandinas causan vasoconstricción, la mayoría de las más importantes parecen ser principalmente agentes vasodilatadores, como la prostaglandina I₂ (prostaciclina) (Guyton y Hall, 1997).

a) BIOSÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS.

En los mamíferos, las prostaglandinas son el producto del metabolismo del ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico) por una familia de enzimas que reciben el nombre de ciclooxigenasas (COX), cuya distribución es ubicua en el organismo. En la actualidad se conocen dos isoformas de la COX: la ciclooxigenasa-1 (COX-1) que se encuentra expresada de manera constitutiva en una gran variedad de tejidos, entre ellos el endotelio y es la encargada de la producción basal de prostaglandinas para el mantenimiento de las funciones biológicas en las que éstas participan, y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), de naturaleza inducible a la que se atribuye la sobreproducción de prostaglandinas en condiciones patológicas como la inflamación crónica (Griswold et al., 1996). Ambas isoformas catalizan los primeros dos pasos de la síntesis de las prostaglandinas que son, la oxidación del ácido araquidónico produciendo el hidroperoxi-endoperóxido PGG₂ y su subsecuente reducción a

hidroxi-endoperóxido PGH_2 . La PGH_2 se transforma por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos en prostanoídes primarios (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 y tromboxano A_2) (Vane et al., 1998) (Figura 3, Baudendistel et al., 1997).

La DM puede modificar selectivamente la liberación de prostaglandinas desde el músculo liso vascular, conservación basal de prostanoídes vasodilatadores y abolición en la producción de prostanoídes vasoconstrictores estimulados por agonistas adrenérgicos. (Andreia Fernanda Carvalho Leone, 2003). Concluye que la inducción de DM experimental en la rata produce una reducción en el efecto contráctil a fenilefrina debido a la falta de relajamiento a un vasoconstrictor prostaglandina del músculo liso vascular. Las diferentes discrepancias en los resultados, se atribuyen al tiempo de exposición de hiperglucemia y a la especie de animal y el lecho vascular estudiado.

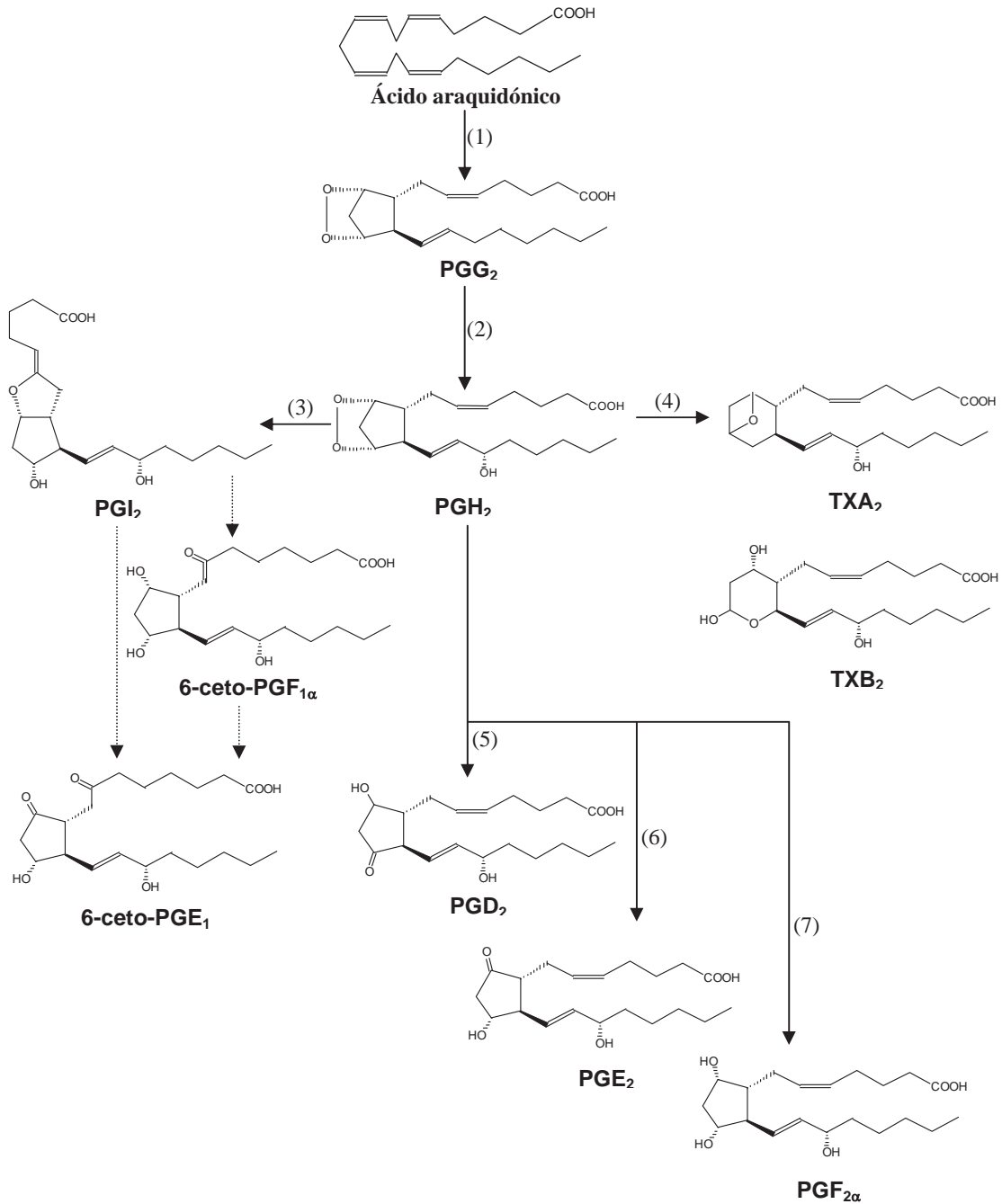


Figura 3. Biosíntesis de prostaglandinas. Abreviaturas: PG = prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), PGI₂ = prostaciclina, TXA = tromboxano. Nomenclatura enzimática: 1 = sintasa de PGG/H (ciclooxigenasa), 2 = sintasa de PGG/H (hidroperoxidasa), 3 = sintasa de prostaciclina, 4 = sintasa de tromboxano, 5 = sintasa de PGD (PGH-D isomerasa), 6 = sintasa de PGE (PGH-E isomerasa), 7 = sintasa de PGF (PGF reductasa). Las líneas punteadas representan procesos no enzimáticos.

1.7 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

ZHU Bang-Hao 2001 et-al, reportan que las respuestas contráctiles a fenilefrina en aorta de rata diabética cambia con el desarrollo de la diabetes y además la cantidad de calcio intra y extracelular, son responsables de las alteraciones de la respuesta contráctil a fenilefrina en diabetes.

S. Bardal 2006 et-al, reporta que en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y tratadas crónicamente con VEGF (factor vascular de crecimiento endotelial) previene la respuesta vascular que es producida por un agonista adrenérgico en ratas y normaliza el entorno oxidativo asociado con esta enfermedad, solo en edades tempranas de DM.

Trabajos previos en nuestro laboratorio, se encuentra que en ratas diabéticas aumentó el efecto máximo y la sensibilidad a fenilefrina. Los resultados indican que la DM altera la expresión de los receptores α_1 , sugiriendo que el aumento contráctil en arterias de ratas diabéticas se debe a un incremento de los receptores α_{1D} y posiblemente α_{1B} . En estas observaciones se descarta la influencia de sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio (PG y NO).

Se ha concluido que la DM en rata Wistar produce un aumento en la contracción de la arteria aorta, debido principalmente al aumento de adrenoreceptores α_{1D} , aunque no se descarta que el subtipo α_{1B} esté participando en el aumento de dicha contracción (Castro Moreno P. 2006)

Fabiano E. Xavier* 2002, encuentra que en ratas con diabetes experimental de una semana, inducida con estreptozotocina, no hay diferencia en el efecto máximo (Emax) y en la sensibilidad (pD2) a fenilefrina respecto a los controles. Sin embargo, a las 4 semanas de diabetes incrementan los

valores anteriores. Al utilizar indometacina en las ratas con 4 semanas de DM, se reduce tanto el pD₂ y el Emax para fenilefrina. Los resultados sugieren que la DM induce cambios dependientes del tiempo en la reactividad vascular a fenilefrina. Aunque dicha respuesta no está relacionada con la reducción de NO (hay aumento), pero puede deberse a un incremento en las protaglandinas H₂ (PGH₂)/tromboxano A₂ (TxA₂) y/o un aumento en flujo extracelular de Ca⁺⁺.

Al remover el endotelio se produce un incremento de similar magnitud en las respuestas a fenilefrina en DM y ratas control, manteniendo el aumento en la contracción en las ratas con DM con 4 semanas. El fármaco SQ2948 reduce el Emax a fenilefrina de las ratas de DM con 4 semanas, pero no las ratas controles. Se ha sugerido dos mecanismos: endotelial (prostanoides) y muscular, actúan independientemente para mantener la hiperreactividad a fenilefrina en vasos diabéticos. (Fabiano E. Xavier* 2002)

1.8 JUSTIFICACIÓN

La DM está asociada con complicaciones que llegan a ser un problema grave de salud pública de magnitud considerable.

Las alteraciones en la función vascular tanto del músculo liso, como en el endotelio han sido implicadas en el desarrollo de las complicaciones vasculares y la disfunción circulatoria durante la DM.

Se conocen trabajos donde mencionan que existe asociación a las posibles causas de dichas alteraciones (ZHU Bang-Hao et-al 2001), sin embargo, poco es el conocimiento acerca de los daños que sufren los vasos y los mecanismos intracelulares que contribuyen a alterar la sensibilidad de ellos durante la DM.

Por consiguiente, en este trabajo se determinó la funcionalidad endotelial inhibiendo óxido nítrico sintasa y con ello ver el papel del NO y de las prostaglandinas, para evaluar el daño a nivel vascular durante esta enfermedad.

Las razones para explicar las diferencias obtenidas en los resultados no son claras, dependen de las condiciones: tipo de arteria, tipo de agonista método usado para los estudios vasculares, en la duración de DM. Fabiano E. Xavier* 2002

1.9 HIPÓTESIS

* La función vascular durante la DM en rata wistar está alterada, y hay mayor contracción dependiente de la concentración.

* Por consiguiente, en este trabajo se determinó la funcionalidad del endotelio a diferentes tiempos de DM, para con ello evaluar el daño producido por el tiempo de exposición a la hiperglucemia durante la diabetes mellitus.

1.10 OBJETIVOS

1.11 OBJETIVO GENERAL

* Evaluar la participación del óxido nítrico y las prostaglandinas en la aorta torácica en ratas diabéticas y no diabéticas

1.12 OBJETIVOS PARTICULARES

*Reproducir el modelo de diabetes experimental en la rata.

*Determinar el efecto del L-NAME sobre la contracción inducida por fenilefrina en aorta con y sin endotelio, de ratas controles y diabéticas.

*Determinar el efecto de la indometacina sobre contracción inducida por fenilefrina en aorta, con y sin endotelio, de ratas controles y diabéticas.

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

2.1 DESARROLLO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES MELLITUS

Se utilizaron ratas Wistar macho de 6 semanas de edad. Se tomó un grupo de 10 ratas como grupo control y otro grupo igual para inducir la diabetes de forma experimental. Para la inducción de la DM se inyectó vía intraperitoneal una sola dosis de estreptozotocina 55 mg/kg (Sigma, S.A), así mismo, las ratas controles se les administró solamente el vehículo al mismo volumen y concentración.

Después de 24 horas y hasta el sacrificio del animal, se midió la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro y tiras reactivas. Solo las ratas con glucosa sanguínea >200 mg/dl se consideraron como diabéticas.

2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En ambos grupos de ratas diabéticas y sanas como control, se realizaron curvas concentración-respuesta al agonista α_1 fenilefrina (1×10^{-9} - $1 \times 10^{-4.5}$ M) para ver la contracción dependiente de la concentración en los tejidos estudiados.

2.3 REACTIVOS

Reactivos adquiridos en Sigma-Aldrich: Fenilefrina, rauwolscina, Propanolol, Carbacol. Todos los reactivos se disuelven en agua destilada. Estreptozotocina este se disuelve en agua desionizada.

2.4 PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las ratas se sacrifican en una atmósfera de CO_2 , después se procede a aislar los vasos en estudio. Mediante una incisión abdominal se extrae arteria aorta torácica, se limpia de tejido conectivo y grasa. Después se corta en anillos de aproximadamente 3-5 mm de longitud, inmediatamente se remueve el endotelio con un dispositivo metálico rugoso frotando la cara luminal, esto con la finalidad de ver una respuesta del músculo liso vascular sin que intervengan factores relajantes provenientes del endotelio. Mientras otro número igual de anillos no se les remueve el endotelio.

2.5 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA

Los anillos de arteria aorta torácica aislados, se sujetan en ganchos de nikrom y se montan en cámaras para tejido aislado la cual debe de tener las condiciones adecuadas de temperatura 37°C y burbujeo constante de

carbógeno: (95% de O₂ y 5% de CO₂) , con 10 ml de solución Krebs con una composición en (mM): NaCl, 11.1; KCl, 4.7; CaCl, 2.5; MgSO₄, 1.2: KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.026 y glucosa 11.1; con un pH de 7.4 (Ibarra et al., 2000).

Cada anillo de arteria se sujeta por un extremo a la base de la cámara con el gancho de nikrom y por el otro lado a un transductor de tensión (FT03 Grass force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Wawick, RI USA),(RI,EUA), el cual a su vez se acopla a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac systems Inc. Santa Bárbara (CA,EUA). Esto se realiza para registrar cambios en la tensión isométrica que produzca el músculo liso arterial.

Ya montados los anillos se les da una tensión inicial de 3 g para la arteria aorta. Después se hace la sensibilización del tejido 3 veces a intervalos de 30 minutos con una concentración submáxima de fenilefrina (1x10⁻⁷M) para arteria aorta. Esto permite que la arteria se contraiga y se establezca la respuesta al estímulo exógeno. En la última sensibilización se probó la presencia de endotelio, al observar la respuesta relajante del tejido cuando se expone a una solución de carbacol (1x10⁻⁶M) (Furchgott y Zawadzki, 1980).

Posterior a la sensibilización del tejido se da un lapso de 30 minutos para que el tejido se reestablezca; durante este tiempo se hacen lavados cada 15 minutos con solución krebs, seguido de una incubación de otros 30 minutos con los bloqueadores (para receptores α₂ y β adrenérgico) Rauwolscina (1x10⁻⁶M), y Propranolol (1x10⁻⁶M) respectivamente, obteniéndose así una curva control (habiendo liberación normal de NO y prostaglandinas).

Posteriormente se prepara nuevamente el tejido, haciendo dos lavados con solución Krebs en media hora y se corre una segunda curva, ahora

incubando nuevamente durante media hora los bloqueadores (α_2 adrenérgico) Rauwolscina ($1 \times 10^{-6} M$) y (β adrenérgico) Propranolol ($1 \times 10^{-6} M$), además de manera alternada L-NAME ($1 \times 10^{-4} M$) para un anillo con y otro sin endotelio, al igual que para indometacina ($1 \times 10^{-5} M$). El propósito de esta curva es observar las variantes buscadas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Al inicio de cada experimento, a la rata se le midió la glucosa sanguínea con ayuda de un glucómetro y tiras reactivas, obteniéndose los siguientes valores:

3.1 REGISTRO DE LA GLUCOSA SANGUÍNEA Y PESO

	Glucosa sanguínea (mg/dl)	Peso (g)
Controles		
7 semanas	81.4 + 6	237.7 + 21.6
18 semanas	95.6 ± 10	386.4 ± 25
Diabéticas		
7 semanas	420.5 + 30	229.8 + 18.5
18 semanas	526 ± 27	221.5 ± 20

Tabla 1. Registros de glucosa y peso de los animales controles y diabéticos de 7 y 18 semanas de edad.

Se observa que conforme aumenta el tiempo de la enfermedad, los animales manifiestan pérdida de peso.

desplazada hacia la derecha respecto a la con endotelio sana. En las arterias sin endotelio tienen el mismo comportamiento, la curva de las arterias diabéticas está desplazada a la derecha respecto a la sana sin endotelio. En esta última, el efecto máximo es casi similar, aunque la diabética requiere de más concentración para empezar a responder.

(Control de 4.5 meses de edad): En la gráfica se aprecia que fenilefrina produce una contracción dependiente de la concentración, o sea que conforme aumenta la concentración del agonista, también aumenta la respuesta de las arterias. El tejido empieza a responder desde la concentración -9 M, pero la respuesta se hace evidente hasta la concentración -8 M. Se observa que tanto en las graficas de las ratas sanas como en las diabéticas, hay diferencia debido a la participación del endotelio, habiendo mayor respuesta en las arterias sin endotelio. Haciendo la comparación entre arterias con endotelio, las diabéticas tienen más sensibilidad a fenilefrina y por lo tanto tienen una contracción notoria. El mismo fenómeno ocurre en las arterias sin endotelio, la respuesta a fenilefrina se dispara hacia la izquierda de las diabéticas. La respuesta de las arterias con endotelio diabéticas asemejan la curva en algunos puntos, pero la sana alcanza mayor respuesta.

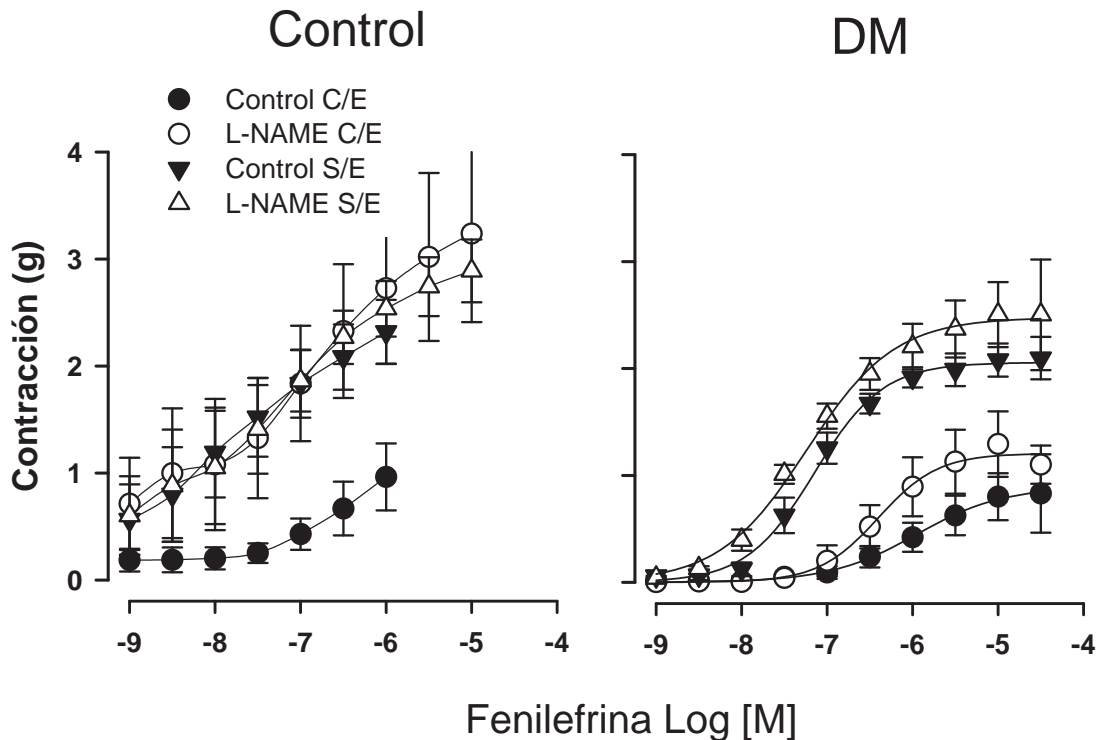


Figura 2. Curva concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta torácica (con y sin endotelio), en ausencia y en presencia de L-NAME, provenientes de ratas controles (izquierda) y con diabetes mellitus DM (derecha) de 7 semanas de edad. Cada punto representa el promedio \pm e.e. de 4-6 experimentos.

(Control) Se observa que la fenilefrina produce una contracción dependiente de la concentración. Al administrar la concentración -9 M hay un aumento en la respuesta de las arterias en ambas curvas. Durante la curva control (primera) se hace evidente que el endotelio está contribuyendo a la regulación del tono vascular, siendo que las arterias sin endotelio contraen más que las que si tienen endotelio. Al incubar L-NAME, hay un desplazamiento hacia la izquierda y semejante de ambas curvas, lo cual imita a la curva control sin endotelio.

(Diabética) Se efectúa una curva dosis respuesta a fenilefrina y existe una contracción dependiente de la concentración. La contracción empieza a ser evidente desde la concentración -8.5 . La curva control nos muestra que hay una diferencia significativa en la modulación del tono vascular ya que la curva

sin endotelio contrae más que la curva de anillos con endotelio. Al incubar L-NAME, hay un desplazamiento de ambas curvas a la izquierda respecto a sus controles. Los anillos de arteria con endotelio incubados con L-NAME, no llegan a imitar a la curva control sin endotelio.

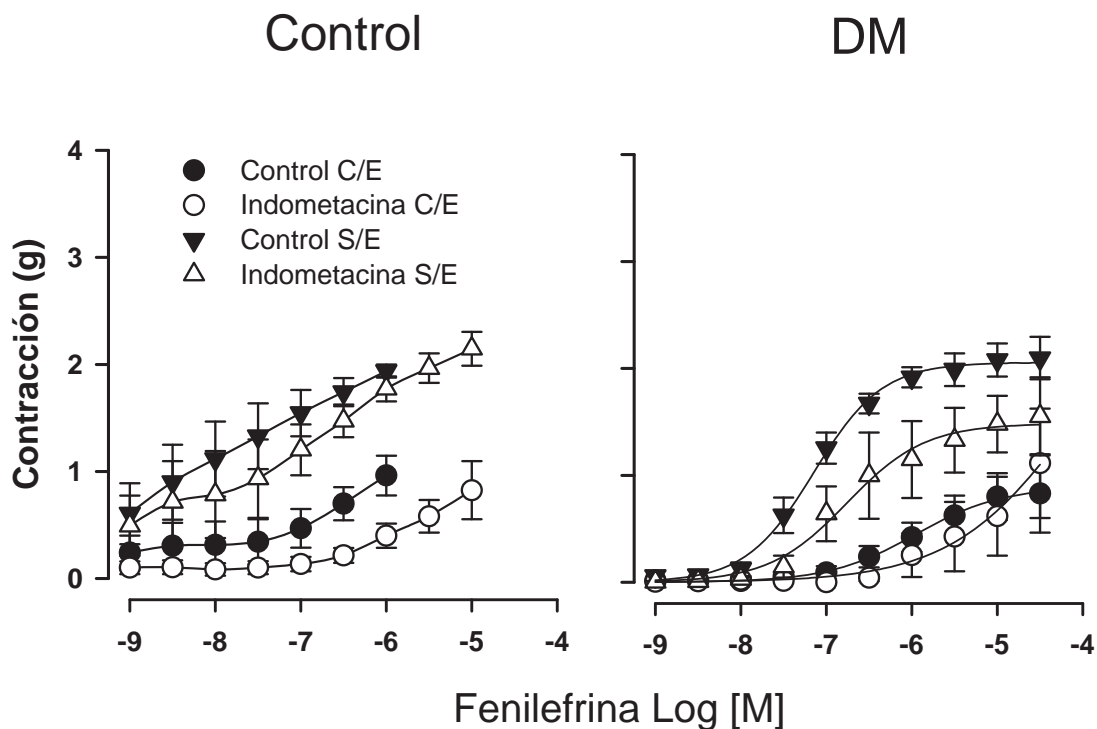


FIGURA 3. Curva concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta torácica (con y sin endotelio), en ausencia y en presencia de indometacina, provenientes de ratas controles (izquierda) y con diabetes mellitus DM (derecha) de 7 semanas de edad. Cada punto representa el promedio \pm e.e. de 4-6 experimentos.

En esta gráfica (control) se observa que los anillos con y sin endotelio se contraen en una manera dependiente de la concentración de fenilefrina. Las arterias empiezan a contraer desde que se administra la concentración 1×10^{-9} M. En la primer curva (control) se observa que el endotelio juega un papel importante en la contracción, ya que las arterias sin endotelio contraen más que las que si tienen endotelio. Durante la segunda curva se incubaba indometacina (inhibiendo a las ciclooxigenasas), y en ambas curvas hay un desplazamiento hacia la derecha respecto a sus controles.

(Diabética) La administración de fenilefrina produce una contracción dependiente de la concentración. Las arterias empiezan a contraer, a diferencia de las controles, con la concentración de -8.5 M. La curva control nos muestra que el endotelio amortigua la contracción inducida por fenilefrina, y se ve claramente que las arterias sin endotelio contraen más que las arterias que si tienen endotelio. Al incubarse con indometacina (inhibidor de las ciclooxigenasas) hay un desplazamiento hacia derecha respecto a los controles. La curva sin endotelio incubada con indometacina se desplaza notoriamente hacia la

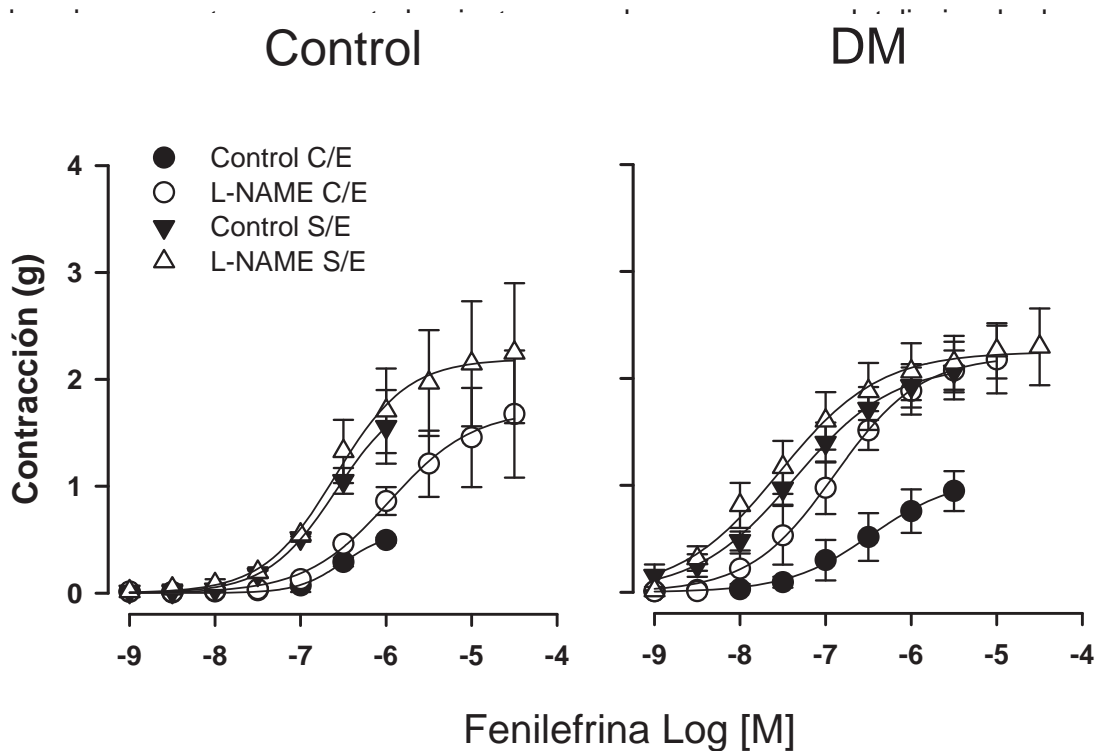


Figura 4. Curva concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta torácica (con y sin endotelio), en ausencia y en presencia de L-NAME, provenientes de ratas controles (izquierda) y con diabetes mellitus DM (derecha) de 4.5 meses de edad. Cada punto representa el promedio \pm e.e. de 4-6 experimentos

(Control): Se observa que la fenilefrina produce una contracción dependiente de la concentración, la contracción empieza a ser evidente a la concentración -8 M. En la primera curva se distingue la mediación del endotelio en la modulación endotelial, teniendo mayor contracción los anillos de arteria sin

endotelio. Para la consecutiva curva, se incubó L-NAME y se observa un ligero desplazamiento a la izquierda de los referentes controles, aunque se ve que tienen mayor sensibilidad, porque logran contraer más y hacen meseta. Los anillos de arteria con endotelio incubados con L-NAME, no llegan a imitar a la curva control sin endotelio.

(Diabética): Se observa en todas las curvas que la fenilefrina produce una contracción dependiente de la concentración. El endotelio está modulando la contracción y se observa más contracción en los anillos de arteria sin endotelio. Al incubarse L-NAME, hay un desplazamiento hacia la izquierda y semejante de ambas curvas, lo cual imita a la curva control sin endotelio.

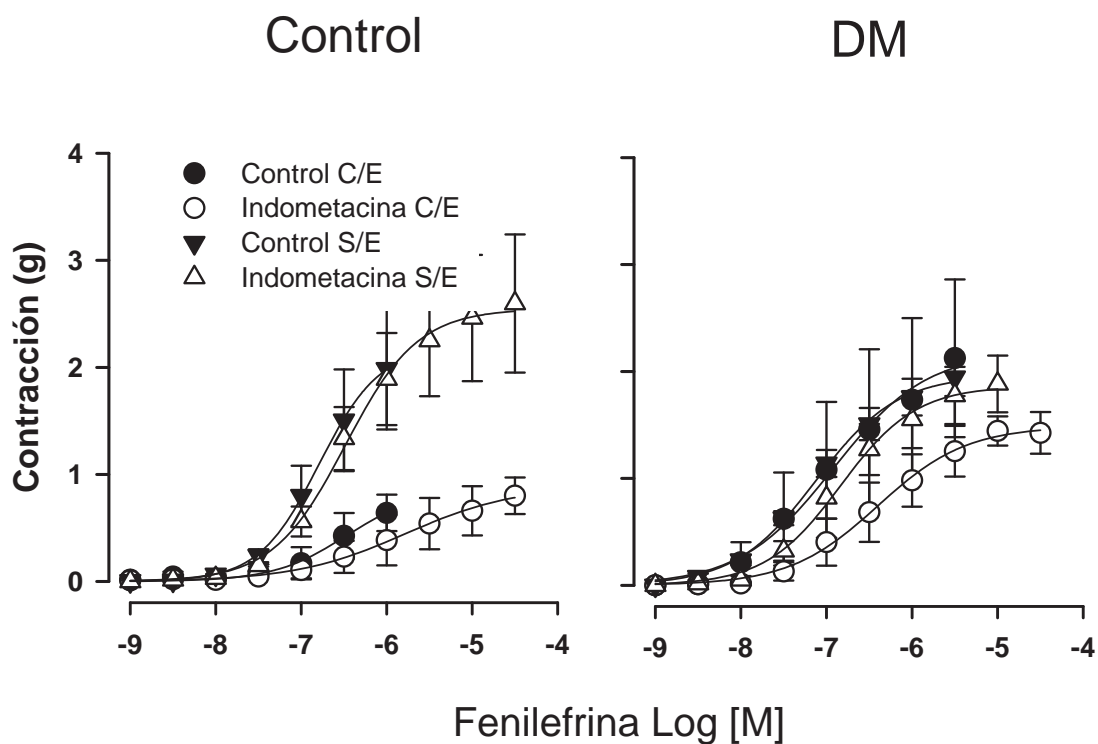


FIGURA 5. Curva concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta torácica (con y sin endotelio), en ausencia y en presencia de indometacina, provenientes de ratas controles (izquierda) y con diabetes mellitus DM (derecha) de 4.5 meses de edad. Cada punto representa el promedio \pm e.e. de 4-6 experimentos.

(control): Se realiza una curva dosis respuesta a fenilefrina y se muestra una respuesta creciente dependiente de la concentración. En ambas curvas (control y con inhibidores) se hace notoria la intervención del endotelio en la modulación de la contracción vascular, habiendo mayor contracción en los anillos de arteria que no tienen endotelio, respecto a la curva control de anillos de arteria con endotelio. Al incubar el inhibidor de las ciclooxigenasas (indometacina), existe un desplazamiento, despreciable, hacia la derecha de sus respectivos controles.

(Diabética): En esta gráfica se observa que los anillos con y sin endotelio se contraen dependiendo de la concentración de fenilefrina, y esta contracción principia a la concentración de 10^{-8} M. Los anillos de arteria sin endotelio tienen mayor contracción dependiente de fenilefrina, que los anillos con endotelio. En la segunda curva se incubó indometacina con la finalidad de bloquear a las ciclooxigenasas. En ambas curvas se observa un desplazamiento a la derecha de sus controles. La curva incubada con indometacina con endotelio, imita el efecto máximo producido a la curva incubada con indometacina sin endotelio.

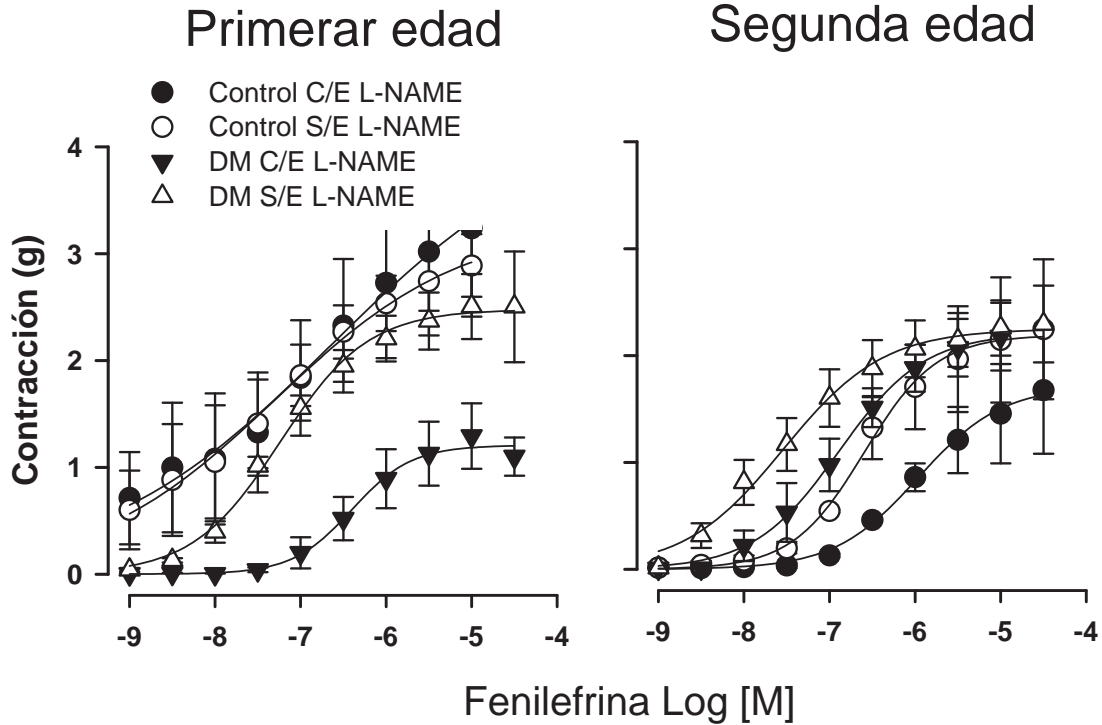


Figura 6. Curva concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta torácica (con y sin endotelio), todas en presencia de L-NAME, provenientes de ratas controles y diabéticas, ambas de diferentes edades; de 7 semanas de edad (izquierda) y 18 semanas de edad (derecha) Cada punto representa el promedio \pm e.e. de 4-6 experimentos.

(L-NAME de 7 semanas de edad): En el gráfico se muestra que fenilefrina produce contracción y esta depende de su concentración. Las curvas de las ratas sanas (con y sin endotelio) tratadas con L-NAME son muy parecidas y no hay diferencia significativa. Las curvas de las ratas diabéticas (con y sin endotelio) muestran una diferencia significativa, la curva que no tienen endotelio se mueve hacia la izquierda pero no llega a tener el mismo efecto máximo que las curvas de las ratas sanas. Hay una diferencia importante: las curvas de arteria con endotelio (diabéticas y sanas) tienen una diferencia significativa; las arterias de rata diabética muestran menor sensibilidad a fenilefrina.

(L-NAME de 4.5 meses de edad): En el experimento se observa una respuesta creciente dependiente de la concentración de fenilefrina. Se observa que tanto en las graficas de las ratas sanas como en las diabéticas, hay diferencia debido a la participación del endotelio, habiendo mayor contracción en las arterias sin endotelio. En la curva de las arterias con endotelio de ratas diabéticas hay mayor sensibilidad a fenilefrina respecto a la rata sana. El mismo fenómeno ocurre en los anillos de arteria sin endotelio, las arterias de rata diabética muestran más sensibilidad a fenilefrina. Hay una diferencia en el efecto máximo, las dos curvas de ratas diabéticas y la arteria sin endotelio de rata sana tienen un efecto similar en el efecto máximo; la arteria de rata sana con endotelio tiene menor efecto máximo.

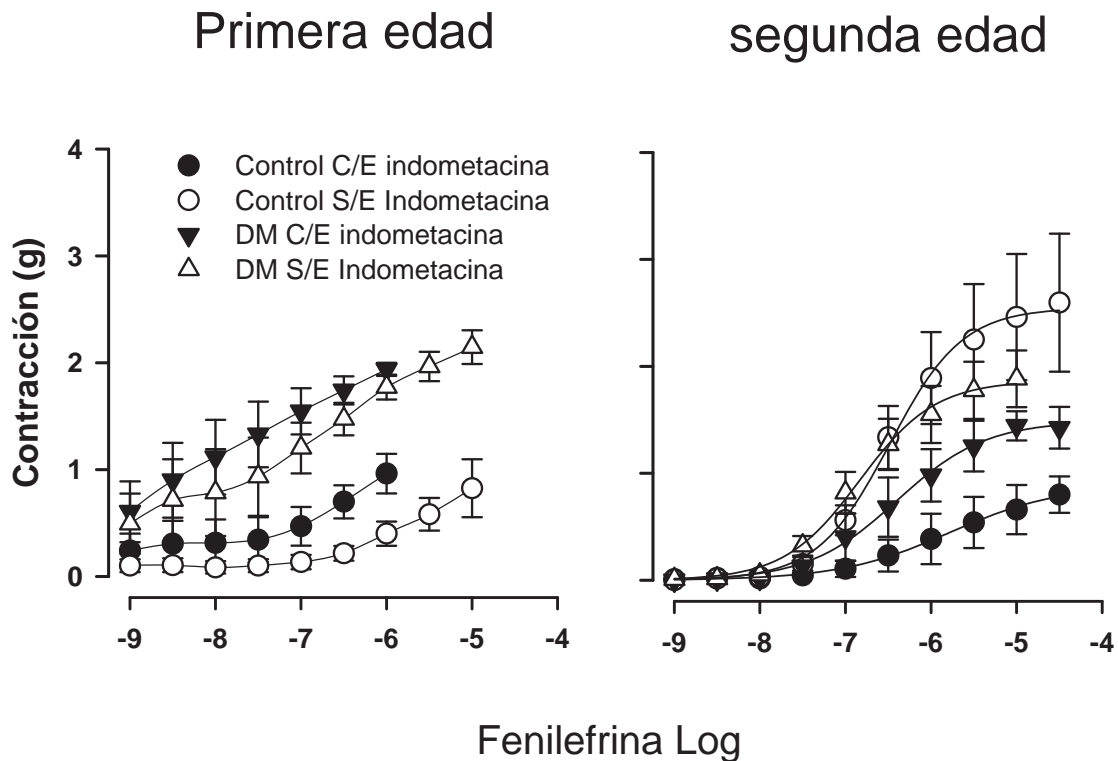


Figura 7. Curva concentración-respuesta a la fenilefrina en aorta torácica (con y sin endotelio), todas en presencia de indometacina, provenientes de ratas controles y diabéticas, ambas de diferentes edades; de 7 semanas de edad (izquierda) y 18 semanas de edad (derecha) Cada punto representa el promedio \pm e.e. de 4-6 experimentos.

(indometacina de 7 semanas de edad): En esta gráfica se observa que los anillos con y sin endotelio se contraen dependiendo de la concentración de fenilefrina. Los anillos de arteria sin endotelio (diabéticas y sanas) tienen mayor contracción respecto a los anillos con endotelio, y esta gráfica se encuentra a la izquierda de sus respectivas. La influencia de la diabetes en las arterias con endotelio, respecto a la sana, hay menor contracción y la gráfica está desplazada paralelamente a la derecha. En las arterias sin endotelio, la diabetes hace el mismo fenómeno, hay menor contracción y la curva está desplazada a la derecha.

(indometacina de 4.5 meses de edad): La contracción de fenilefrina empieza a ser evidente a la concentración 10^{-8} M y todas alcanza un efecto máximo diferente. Las gráficas de arteria con endotelio tienen menor sensibilidad a fenilefrina y se nota como las arterias sin endotelio están a la izquierda respecto a las que tienen endotelio. La participación del endotelio es evidente haciendo la comparación en las ratas sanas, se ve como la curva sin endotelio está muy a la izquierda respecto a la que tiene endotelio. El mismo fenómeno ocurre en los gráficos de las arterias de rata diabética. La influencia de la diabetes es notoria y, en las curvas de anillos con endotelio (diabéticas y sanas) las diabéticas contraen más. Lo contrario sucede en arterias sin endotelio: las arterias de rata diabética contraen menos que la rata sana.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En humanos, la disfunción endotelial está asociada con el desarrollo de retinopatía diabética, nefropatía y aterosclerosis en ambos tipos de diabetes. La función endotelial en diabetes ha sido estudiada a responder diversas cuestiones: 1) la microalbuminuria está acompañada con una severa disfunción endotelial? 2) la hiperglucemia es suficiente para causar el mínimo tipo de disfunción endotelial? 3) cual es el significado del descubrimiento de la resistencia a la insulina asociada con la disfunción endotelial?. 4) cuales son los mecanismo que causan la disfunción endotelial asociada con la DM? (CASPER G. schalkwijk and Coen D. A. STEHOUWER. 2005.)

La resistencia a la insulina usualmente precede con el desarrollo de DM2 y a menudo acompañada de un grupo de factores de riesgo. (CASPER G. schalkwijk and Coen D. A. STEHOUWER. 2005.). En diabetes, la hiperglucemia y los componentes del síndrome metabólico causan disfunción endotelial directa ó indirectamente.

El rol que tiene el endotelio en el control de la función vascular (H. HURAIRAH, A. FERRO. 2004.). además de anomalías del sistema NO/L-arginina, se ha demostrado que los niveles de endotelina-1 están elevados en pacientes con DM2 no complicada.

La principal finalidad de este trabajo, es mostrar que el endotelio tiene una contribución importante en la contracción vascular estimulada por fenilefrina (agonista adrenérgico α -1), tanto de ratas controles como diabéticas.

La diabetes mellitus está asociada con daño vascular, y el estudio de estos cambios en la contracción está atribuido a diferentes factores como: tipo de arteria en estudio, método usado para los estudios vasculares, tipo de agonista usado y duración de la diabetes. (Fabiano E. Xavier 2002).

La disfunción endotelial es considerada un componente temprano de disfunción endotelial (S. Bardal, colaboradores. 2006), y en edades tempranas de DM, esta disfunción está presente; el entorno oxidativo asociado a esta enfermedad (nitritos, nitratos, anión superóxido) aumenta el riesgo de retinopatía, neuropatía y aterosclerosis, resultado de una exposición prolongada a los altos niveles de glucosa sanguínea.

En este estudio, el tratamiento con factor de crecimiento endotelial vascular, (usados actualmente en el tratamiento de granulocitopenia, síndromes mielodisplásicos, leucemias, anemia aplásica, traslantes de médula ósea), indica que el endotelio es capaz de preservar la integridad en edades tempranas de DM, aunque hay una sobreexpresión de eNOS. (S. Bardal, colaboradores. 2006).

Se ha observado que a diferentes tiempos de duración de diabetes experimental se presentan cambios en la contracción estimulada por un agonista adrenérgico. Tales cambios, como lo señala ZHU Bang-Hao 2001, propone que el Ca^{++} contribuye a la contracción inducida por fenilefrina. Conforme la diabetes avanza, a las 6 semanas de DM se observa que las ratas pierden peso en un 15% comparado con su control.

En las diferentes edades (2 y 6 semanas) estudiadas por ZHU Bang-Hao 2001, se observa que en la DM hay mayor sensibilidad respecto a sus controles. La gráfica 1 nos muestra que a la primera edad (1 semana con DM)

la presencia del endotelio se hace evidente, porque la contracción de los anillos de arteria sin endotelio es mayor que los anillos con endotelio, además los anillos de arteria de rata diabética contraen menos que su control, esto nos sugiere que en edades tempranas de diabetes, hay mayor producción de un factor relajante (NO) y por eso vemos mayor relajación respecto a su control (L. J.).

En la segunda edad (18 semanas) se sigue observando que las arterias sin endotelio contraen más comparadas con las arterias con endotelio. Al contrario de lo que sucede en la primera edad, las ratas diabéticas (con y sin endotelio) presentan mayor contracción que los controles respectivos. ZHU Bang-Hao 2001 encuentra que a las 6 semanas de DM, hay una diferencia en el Emax, las ratas diabéticas presentan mayor contracción en un 40% respecto a su control.

Partiendo de las diferencias en la contracción, se realiza una segunda curva en anillos de arteria con y sin endotelio a fenilefrina para evaluar cuáles son los mecanismos vasorelajantes que están actuando en la contracción (óxido nítrico principalmente); para esto se inhibe la sintasa de óxido nítrico utilizando L-NAME en anillos con y sin endotelio.

Además también se evalúa la participación de sustancias contráctiles (prostanoides) empleando indometacina para inhibir a las ciclooxigenasas (COX1 y COX2) en anillos de arteria con y sin endotelio.

La microalbuminuria es un factor de riesgo para la progresión de una enfermedad renal en DM1, enfermedad cardiovascular y su presencia es un signo inicial de nefropatía diabética y de aterotrombosis. (CASPER G. schalkwijk and Coen D. A. STEHOUWER. 2005). Diversos estudios sugieren

que es un factor de riesgo importante para enfermedad cardiovascular y define un grupo de alto riesgo de mortalidad cardiovascular temprana tanto en DM2 como en la hipertensión arterial. (Shalkwijk et-al 2005). Se señala además que si ña microalbuminuria está presente, es indicaciónj de una permeabilidad incrementada de las células endoteliales e implica la presencia de cierto nivel de lesión de modo que está comprometida la respesta vascular, al igual que los componentes del síndrome metabólico pueden dañar la función endotelial.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y

BIBLIOGRAFÍA

5.1 CONCLUSIONES

La DM produce alteraciones en la liberación de factores endoteliales y estos contribuyen a la disfunción endotelial reportada en esta patología. La disfunción endotelial es dependiente del tiempo de duración de la DM, aumentado la sensibilidad a fenilefrina.

5.2 PERSPECTIVAS

Queda como perspectiva de trabajo elucidar cuáles son las isoformas de COX y su mecanismo de acción sobre la contracción de las arterias.

5.3 BIBLIOGRAFÍA

LIBROS

1. Harrison; 2001. Principios de medicina interna. 15 edición; editorial McGraw-Hill, Vol I. pp. 1274-1303.
2. Ganong, W. F.; 2000. Fisiología médica. Edición 17. Manual moderno. pp 53; 637-655; 657-672; 707-713.
3. Mathews 2033 et-al. Bioquímica. Tercera edición. Editorial pearson Addison Wesley.
4. Davis S. N. Y Granner D. K. "INSULINA, FÁRMACOS HIPOGLUCEMIANTES ORALES Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL PÁNCREAS ENDÓCRINO" tomado de Goodman Gilman; 2003. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Hardman J.G.; Limbird L. E.; Molinoff R. W.; Gilman A. G. Décima edición; editorial McGraw-Hill: Capítulo 61, Vol. II p.p.
5. MASHARANI U. 2006 tomado de Diagnóstico clínico y tratamiento 2006. Tierney L.M. Jr, MCPHEE S.J., PAPADAKIS M.A. Capítulo 27. Manual moderno 41ª edición, traducido de la 44ª edición en inglés. pp. 1041-1081.
6. Arias P. capítulo 39 "PÁNCREAS ENDÓCRINO" pp. 701-732. Lermori R.H. Capítulo 4 "EL ÓRGANO ENDOTELIAL" pp. 53-72. Duarte M. y Dvorkin M. A. capítulo 16 "PRESIÓN ARTERIAL" pp. 242-261. Tomado de Best ð Taylor. 2003. Bases fisiológicas de la práctica médica. 13ª edición en español, editorial panamericana.

ARTÍCULOS

1. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. volumen 26, supplement 1, January 2003. p.p. 5

2. ZHU Bang-Hao, Guan Yong-Yuan, HE Hua. 2001. Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stages of diabetic duration. Department of pharmacology, Sun Yat-Sen University of medical sciences, Guangzhou 510089, China
3. S. Bardal, colaboradores. 2006. Chronic treatment with vascular endothelial growth factor preserves agonist-evoked vascular responses in the streptozotocin-induced diabetic rat. College of medicine, university of Saskatchewan, Canada.
4. CASPER G. schalkwijk and Coen D. A. STEHOUWER. 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. University of Maastricht, the Netherlands.
5. H. HURAIRAH, A. FERRO. 2004. The role of the endothelium in the control of vascular function. Department of clinical pharmacology, GKT school of medicine (cardiovascular division), king's college London.

OTROS:

www.dgepi.salud.gob.mx

www.insp.mx/ensa2000